



**Maria José da Costa
Pinho Silveira**

***Acinetobacter baumannii* em meio hospitalar**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2010/2011

**Maria José da Costa
Pinho Silveira**

***Acinetobacter baumannii* em meio hospitalar**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora auxiliar do Departamento de biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora auxiliar do departamento de biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira
Investigadora em Pós-Doutoramento do CESAM

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora auxiliar do departamento de biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, professora Sónia Mendo, um exemplo singular de profissionalismo, por toda a dedicação, companheirismo e ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Ao hospital Infante D. Pedro, em especial ao director do serviço de patologia clínica, Dr. Elmano Ramalheira, pela cedência das estirpes, tornando possível a realização deste estudo. Neste contexto prolongo os meus agradecimentos à coordenadora dos técnicos de análises clínicas Manuela Luís e à técnica Raquel Diaz por toda a amizade, incentivo, ajuda e dedicação.

À Cátia, que além de ser uma pessoa fantástica, me ajudou em todos os momentos, incentivou e ensinou. Por toda a dedicação, compreensão, amizade e companheirismo e porque sem ti nada teria sido igual.

E por fim, mas não menos importante, a todas as pessoas do LBM, que me ajudaram em todos os instantes e fizeram-me passar horas maravilhosas e fantásticas que jamais esquecerei.

Muitissimo obrigada a todos.

palavras-chave

Acinetobacter baumannii; Multirresistência; β -lactamases; Integrões classe 1.

resumo

A espécie *Acinetobacter baumannii* é um microrganismo multirresistente, frequentemente associado a surtos e infecções nos cuidados de saúde. A presença de uma grande variedade de factores determinantes na resistência aos antibióticos, juntamente com a sua capacidade de regular esses mecanismos e se adaptar sob condições ambientais adversas, faz com que esta espécie seja centro de preocupação para a Saúde pública.

A sua disseminação na maior parte das vezes clonal, dentro das instituições de saúde, faz com que este patógeno nosocomial, esteja associado a elevadas taxas de mortalidade e morbidade.

Os 47 isolados de *A. baumannii* foram isolados a partir de diferentes amostras biológicas provenientes de pacientes com exame bacteriológico positivo. Estas amostras deram entrada no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Infante D. Pedro, e a faixa etária em que *A. baumannii* foi isolada com maior frequência está compreendida entre 81 e 90 anos de idade, facto provavelmente devido a um sistema imunitário mais fragilizado. Relativamente ao serviço onde surgiu um maior número de *A. baumannii* foi o Serviço de Medicina Intensiva (SMI), sendo a prevalência por produto biológico verificado em expectorações e urinas, facto justificado pela capacidade deste microrganismo aderir facilmente a superfícies, como algalias e tubos de ventilação.

No que refere aos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), *A. baumannii* é mais sensível à colistina, uma polimixina E, usada actualmente como último recurso para o tratamento de infecções por este patógeno. Sendo este um microrganismo multirresistente, isso implica resistência a praticamente todas as classes de antibióticos testados. No entanto, os mecanismos responsáveis por estas resistências devem ser estudados, uma vez que apesar do fenótipo observado, a pesquisa de alguns dos genes frequentemente associados a essas resistências foi negativa. Foram encontrados genes de resistência associados a integrões de classe 1, e foi detectada a presença de elementos genéticos móveis, nomeadamente a presença de plasmídeos.

O estudo mais aprofundado dos mecanismos de resistência destes patógenos é fundamental, de forma a melhor conhecer as opções terapêuticas existentes. Por outro lado torna-se importante perceber os mecanismos de disseminação deste patógeno em ambiente hospitalar.

keywords

Acinetobacter baumannii; Multidrug resistant; β -lactamases enzymes; Class 1 integron

abstract

Acinetobacter baumannii is a multiresistant and pathogenic organism, commonly associated to outbreaks, clinical infections and hospital environment. These species present different antibiotic resistant determinants and different resistance mechanisms, but they have the ability to adapt to adverse environment conditions, and are therefore of concern to public health of the society.

The dissemination of these nosocomial pathogenic species, frequently clonal, is the main problem associated to the high mortality and morbidity rate, within the hospital environment.

To perform this work 47 *A. baumannii* isolates were collected from different biological samples from patients with a positive bacteriologic test. The statistic analysis was performed by the Clinical Pathology Service of the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro. *A. baumannii* were frequently isolated from the age group between 81 and 90 years old. Probably, these results are due to a weak immune system. The isolates were collected mainly from intensive care unit (SMI) and from the following biological samples: sputum and urines, maybe because these isolates have the ability to adhere to the surfaces, such as catheters and ventilation tubes.

Antibiotics susceptibility tests were performed, showing that *A. baumannii* isolates are only susceptible to colistin, a polymyxin E, that are used as the last resource to threat *A. baumannii* infections. These tests also showed that *A. baumannii* isolates are multidrug resistant, however the presence of β -lactamases genes was negative. Nevertheless some antibiotic resistance genes were associated to class 1 integrons. The presence of mobile genetic elements, namely plasmids, was found in some isolates.

Further studies exploring the resistance mechanisms of these pathogenic isolates are still required in order to increase the therapeutic options to threat nosocomial infections caused by this organism. Also, identify the source of dissemination of this pathogen within the hospital environment is of utmost importance.

Índice

1	Introdução	4
1.1	Perspectiva histórica do género <i>Acinetobacter</i>	5
1.1.1	Taxonomia.....	5
1.1.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6
1.2	Antimicrobianos.....	12
1.2.1	Antibióticos Inibidores da síntese da parede celular	14
1.2.2	Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos.....	18
1.2.3	Inibidores da síntese proteica	20
1.2.4	Antibióticos antimetabolitos.....	22
1.3	Resistência Bacteriana: papel dos elementos genéticos móveis.....	24
1.3.1	Transferência de genes	24
1.3.2	Elementos genéticos móveis.....	26
1.4	Genotipagem	29
2	Objectivos	31
3	Material e métodos	32
3.1	Isolados bacterianos	32
3.2	Identificação dos isolados bacterianos	32
3.2.1	Coloração de Gram.....	32
3.3	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	35
3.3.1	Antibióticos testados para <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
3.4	Amplificação de fragmentos de DNA por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
3.4.1	Pesquisa de Integrões Classe 1	37
3.4.2	Pesquisa de Integrões de Classe 2 e 3.....	38
3.4.3	Pesquisa de elementos ISCR.....	38
3.4.4	Pesquisa de genes que codificam para enzimas Beta-lactamases	39
3.4.5	Pesquisa de genes <i>qnr</i>	40
3.4.6	Pesquisa de grupos de Incompatibilidade de Plasmídeos.....	41
3.5	Estudo da variabilidade genética	42
3.6	Purificação e Sequenciação de produtos de PCR.....	43
3.7	Electroforese em gel de agarose e visualização do DNA.	43
4	Resultados e Discussão.....	44
4.1	Dados Epidemiológicos.....	44
4.1.1	Prevalência de <i>Acinetobacter baumannii</i> por Idade e Sexo	44
4.1.2	Prevalência de <i>A. baumannii</i> por Serviço Hospitalar	45
4.1.3	Prevalência de <i>A. baumannii</i> por produto biológico.....	45
4.2	Perfil de resistência aos antibióticos dos isolados de <i>A. baumannii</i>	47
4.2.1	Perfil de resistência/sensibilidade de <i>A. baumannii</i> aos antibióticos testados	47
4.3	Pesquisa de Integrões	50
4.3.1	Pesquisa de Integrase classe 1 em <i>Acinetobacter baumannii</i>	50

4.3.2	Pesquisa das Zonas Variáveis	51
4.3.3	Pesquisa de sul3 e tniC.....	52
4.3.4	Pesquisa de elementos ISCR1.....	52
4.3.5	Pesquisa de Integrões de classe 2 e Integrões de classe 3.....	52
4.4	Pesquisa de genes de β - Lactamases	52
4.5	Pesquisa de genes <i>qnr</i>	53
4.6	Pesquisa de grupos de incompatibilidade de plasmídeos.	53
4.7	Estudo da variabilidade genética	54
5	Conclusão	56
6	Bibliografia.....	58

Índice de Figuras

Figura 1 :	A figura mostra uma fotografia de microscopia electrónica da espécie de <i>Acinetobacter baumannii</i> (Bergogne-Bérezin,E, Towner,K, 1996).	6
Figura 2:	A figura ilustra a espécie de <i>Acinetobacter baumannii</i> ao microscópio e as respectivas colónias em meio de MacConkey agar.....	11
Figura 3:	A figura representa a estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado Suárez,C, Gudíol,F, 2009).	15
Figura 4:	Resumo das etapas de formação da parede celular (adaptado de Suárez,C, Gudíol,F, 2009).	16
Figura 5:	Ilustração do mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Suárez,C, Gudíol,F, 2009).	17
Figura 6:	Representação da estrutura química básica das Quinolonas, de onde resultam diferentes gerações de quinolonas.	19
Figura 7:	A figura representa a estrutura química de dois aminoglicosídeos.	21
Figura 8:	A figura esquematiza a estrutura do Sulfametoxazol e Trimetoprim, respectivamente (Masters, P, 2003).	23
Figura 10:	Representação esquemática das diferentes formas de transferência de genes entre bactérias. I: Transdução, II: Conjugação e III: Transformação.	25
Figura 11:	Representação esquemática de um plasmídeo.	26
Figura 12:	Esquematização da estrutura do integrão classe 1.	28
Figura 13:	Esquematização da inserção de uma cassette de genes e do mecanismo de expressão dos genes associados a um integrão, imagem adaptada de Harbottle, H, <i>et al.</i> , 2006).	29
Figura 14:	Esquematização das diferenças morfológicas entre a parede celular de bactérias de Gram-Positivo e de Gram-Negativo (adaptado de Alberts, B, <i>et al.</i> , 2001).	33
Figura 15:	A figura ilustra a coloração de Gram : cocos de Gram-Positivo (esquerda) e bastonetes de Gram-Negativo (direita)	33
Figura 16:	Esquematização de Identificação/ TSA no sistema VITEK 2.	35
Figura 17:	Distribuição de <i>A. baumannii</i> por faixa etária (A) e por sexo (B).	44
Figura 18:	Percentagem de infecções por <i>A. baumannii</i> por serviço hospitalar.....	45
Figura 19:	:Frequência de isolados de <i>A. baumannii</i> por produto biológico.....	46
Figura 20:	Perfil de susceptibilidade/resistência de <i>A.baumannii</i> às diferentes classes de antibióticos testados.....	47

Figura 21: Percentagem de gente <i>int1</i> em <i>Acinetobacter baumannii</i>	50
Figura 22: Percentagem de zonas variáveis em 79% isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> com <i>Int1</i>	51
Figura 23: Electroforese em gel de agarose das amostras de <i>A.baumannii</i> contendo <i>Int 1</i> , sujeitas à amplificação da respectiva Zona Variável	51
Figura 24: Integrão e respectivos genes cassetes encontrados nos isolados positivos para Integrase Classe 1 e com Região Variável amplificada.....	52
Figura 25: Imagem de electroforese do perfil dos respectivos isolados de <i>A. baumannii</i> por BOX-PCR	54
Figura 26: Dendograma obtido de forma a avalia a variabilidade genética dos isolados recolhidos.....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais grupos de antimicrobianos e seus mecanismos de acção (adaptado de Calvo, J, <i>et al.</i> 2009)	13
Tabela 2:Antibióticos testados em <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
Tabela 3:Reagentes e os respectivos volumes utilizados para uma reacção de PCR.....	37
Tabela 4: Sequência dos primers para pesquisa do gene codificante da integrase classe 1 (<i>Int 1</i>), das zonas variáveis (<i>Zv</i>) e tamanhos esperado dos respectivos fragmentos.	37
Tabela 5:Condições utilizadas nas reacções de amplificação do gene <i>Int1</i> e respectivas zonas variáveis.	37
Tabela 6: Sequência dos primers para pesquisa do gene codificante da integrase classe 2 e 3, e tamanhos dos respectivos fragmentos.	38
Tabela 7: Condições utilizadas nas reacções de amplificação do gene <i>Int2</i> e <i>Int3</i>	38
Tabela 8: Sequência dos primers para pesquisa do gene codificante de CR, e tamanhos dos respectivos fragmentos.....	38
Tabela 9:Condições utilizadas nas reacções de amplificação da sequência CR.	39
Tabela 10:Sequência dos primers para pesquisa dos diferentes genes que codificam para as enzimas beta-lactamases, e tamanhos esperado dos respectivos fragmentos.	39
Tabela 11:Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos genes das diferentes beta-lactamases.....	40
Tabela 12:Sequência dos primers para pesquisa dos genes <i>qnrs A,B e S</i> , e tamanhos dos respectivos fragmentos.....	40
Tabela 13: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos genes <i>qnr A, B e S</i>	41
Tabela 14:Reagentes e os respectivos volumes utilizados para uma reacção de multiplex de grupos de incompatibilidade.	41
Tabela 15:Sequência de primers utilizados no multiplex para a pesquisa de grupos de incompatibilidade de	41
Tabela 16: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos grupos de incompatibilidade	42
Tabela 17: Sequência dos primers para amplificação por BOX-PCR.	42
Tabela 18: Condições utilizadas nas reacções de amplificação por BOX-PCR.	42

1 Introdução

O sucesso inicial e aparentemente imparável dos antibióticos, tem vindo a ser combatido pelo aumento da resistência bacteriana, pelo que poderemos estar a enfrentar o fim da “era dos antibióticos” (Perez, F, *et al.*, 2007).

Os antibióticos têm a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, sendo referidos como bacteriostáticos, ou mesmo de provocar a sua morte, sendo designados bactericidas. Contudo, as bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência, em resposta aos antimicrobianos, e transmiti-los à descendência. A resistência aos antibióticos é uma consequência do uso excessivo e inadequado destes compostos na terapêutica, e do seu uso incorrecto na agropecuária e na agricultura, onde é usado como factor de crescimento (MacGowan, A, 2008). Estudos, referem ainda, que alguns dos factores de risco mais frequentemente associados ao aumento das resistências a nível hospitalar são: prolongados tempos de internamento, idade avançada dos pacientes, uso de dispositivos invasivos que favorecem a transmissão e colonização, imunossupressão, falta de cuidados por parte dos profissionais de saúde que poderão promover a transmissão destes microrganismos e terapêuticas antimicrobianas empíricas.

Assim, a emergente resistência aos antibióticos causou um dilema para a saúde pública, agravada pela falta de novas opções terapêuticas (Siegel, R, 2008).

Microrganismos patogénicos, como *Acinetobacter baumannii* possuem uma grande variedade de mecanismos de resistência, e por isso, geralmente estão associados a surtos hospitalares. Em alguns casos, esses patogéneos podem mesmo manifestar resistência a todos os compostos actualmente disponíveis para utilização na clínica podendo, adicionalmente, ter a capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência (Perez, F, *et al.*, 2007). O aparecimento de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) na comunidade veio alarmar ainda mais esta realidade assustadora. Além disso, os carbapenemos, que são actualmente a classe de antibióticos de maior sucesso, têm mostrado sinais de vulnerabilidade (Siegel, R, 2008). Assim, a valorização crescente na clínica de *A. baumannii* multirresistentes é uma realidade assustadora e que necessita de estratégias que controlem esta ameaça (Dijkshoorn, L, *et al.*, 2007). Portanto, enquanto a busca por novas opções de antibióticos continua, há uma urgente necessidade de desenvolver estratégias que deverão retardar o desenvolvimento da resistência aos antibióticos disponíveis actualmente, tais como: i) evitar o uso prolongado de antibióticos e ii) o conhecimento da susceptibilidade

antimicrobiana, de modo a evitar a precoce e agressiva terapêutica empírica (Harbottle, H, *et al.*, 2006).

1.1 Perspectiva histórica do género *Acinetobacter*

O género conhecido como *Acinetobacter* tem sofrido modificações taxonómicas significativas nos últimos trinta anos (Peleg, A, *et al.*, 2008). Surgiu no início do século XX, em 1911, quando Beijerinck, um microbiologista dinamarquês, descreveu um organismo isolado após enriquecimento do solo com um meio contendo acetato de cálcio e ao qual chamou *Micrococcus calcoaceticus*. Nas décadas seguintes, descreveu organismos semelhantes, que foram atribuídos a pelo menos 15 géneros e espécies diferentes, incluindo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes*, *Haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Bactéria anitratum*, *Moraxella lwoffivar*, *Achromobacter anitratus*, entre outros (Torres, A, *et al.*, 2010).

Assim, a actual designação do género *Acinetobacter*, do grego ακινετος (akinetos) e que significa imóvel, foi proposta inicialmente por Brisou e Pévot, em 1954, de modo a permitir a diferenciação dos microrganismos móveis dentro do género *Achromobacter* (Torres, A, *et al.*, 2010).

O género *Acinetobacter* spp. é constituído por 31 espécies diferentes das quais 17, são raramente isoladas em humanos (Peleg, A, *et al.*, 2008). Entre as diferentes espécies existentes, *A. baumannii* é considerada a espécie de maior importância clínica. Esta espécie faz parte do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* que, por sua vez, compreende quatro diferentes espécies: *Acinetobacter* genoespécie 3 e 13 TU, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter baumannii* (Giamarellou, H, *et al.*, 2008). Contudo, a distinção destas espécies só é possível por métodos genotípicos, sendo impraticável na rotina diária do laboratório de microbiologia clínica (Peleg, A, *et al.*, 2008).

1.1.1 Taxonomia

Baseado na mais recente taxonomia, o género *Acinetobacter*, foi transferido da família *Neisseriaceae* passando a ser classificado como pertencendo à família *Moraxellaceae*, dentro da ordem *Gammaproteobacteria*, que inclui os géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados (Fournier, P, Richet, H, 2006). É ainda definido como, um cocobacilo de Gram-Negativo, aeróbio estrito, não fermentador da

lactose, não fastidioso, imóvel, cuja espécie mais representativa e com maior importância clínica é *A. baumannii* (Montefour, K, *et al.*, 2008).

Com a evolução das técnicas de biologia molecular, Bouvet e Grimont, publicaram uma classificação baseada na comparação do DNA, contendo 12 genoespécies, nas quais se inclui a espécie de *A. baumannii*. A partir desta classificação foram efectuados vários estudos, dentro dos quais foram identificadas diferentes espécies. Assim, a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* foi dividida em quatro subespécies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, genoespécie 3 e genoespécie 13 TU que formam o complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, devido à dificuldade na separação destas espécies por métodos convencionais (Peleg, A, *et al.*, 2008).

Até à data, já foram descritas 31 espécies baseadas nas características genotípicas (Dijkshoorn, L, *et al.*, 2007).

1.1.2 *Acinetobacter baumannii*

A espécie *A. baumannii* (Figura 1) é um dos representantes mais importantes do género *Acinetobacter*, e emergiu como um dos patógenos globalmente mais problemáticos para as instituições de saúde. A sua importância clínica, especialmente, nos últimos 15 anos, tem sido impulsionada pela sua notável capacidade de se auto regular, ou adquirir mecanismos de resistência, tornando-o, portanto, um dos microrganismos que ameaça a era dos antibióticos (Peleg, A, *et al.*, 2008). Além do incrível perfil de resistência emergente, esta espécie tem a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo em meio hospitalar, potenciando a sua capacidade de disseminação nosocomial (Falagas, M, *et al.*, 2006).

Assim, tornam-se alvo principal destes microrganismos, os indivíduos mais vulneráveis, que se encontrem internados, com infecções graves ou com danos na integridade da pele e protecção das vias aéreas (Sebeny, P, *et al.*, 2008).

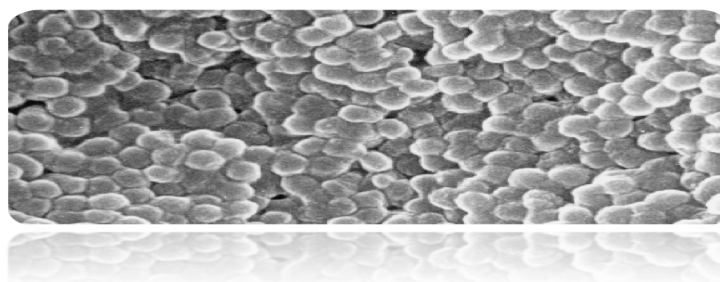


Figura 1 : A figura mostra uma fotografia de microscopia electrónica da espécie de *Acinetobacter baumannii* (Bergogne-Bérezin, E, Towner, K, 1996).

1.1.2.1 Epidemiologia

O género *Acinetobacter* possui uma elevada versatilidade nutricional e metabólica, podendo adaptar-se facilmente a diferentes ambientes (Peleg, A, *et al.*, 2008). *A. baumannii* é considerado um microrganismo ubíquo na natureza e tem sido isolado a partir do solo, água, animais, da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis. Além disso, no ambiente hospitalar, algumas espécies têm sido isoladas de objectos inanimados, tais como: equipamentos de Raio X, bancadas, ventiladores e sistemas de circulação de ar (Barchiatta, M, *et al.*, 2009). Têm a capacidade de sobreviver durante prolongados períodos de tempo, e numa vasta gama de condições ambientais (Fournier, P, Richet, H, 2006), e por isso podem ser encontrados tanto em superfícies secas como húmidas (Montefour, K, *et al.*, 2008).

Faz parte da flora normal da pele e são também frequentemente isolados a partir do tracto respiratório e garganta de indivíduos hospitalizados (Maragakis, L, Perl, T, 2008).

É um microrganismo oportunista, e é capaz de causar infecções nosocomiais, e infecções na comunidade, embora alguns estudos relatem que, pelo menos na Europa, as taxas de colonização e infecção por *A. baumannii* na comunidade sejam relativamente baixas (Torres, A, *et al.*, 2010).

Estes microrganismos, são ainda responsáveis por surtos de infecções a nível hospitalar, incluindo bacteriemias, pneumonias, meningites, infecções do tracto urinário e infecções em lesões (Maragakis, L, Perl, T, 2008). A sua grande resistência aos antimicrobianos, limita as opções terapêuticas aumentando, por isso, as taxas de mortalidade e morbilidade, independentemente dos factores associados (Falagas, M, *et al.*, 2006).

1.1.2.2 Factores de Virulência

A. baumannii é a espécie de maior importância clínica do género *Acinetobacter*. Contudo, esta espécie não é altamente virulenta, e a sua capacidade de causar doenças está subjacente ao estado do doente que coloniza. Assim, diversos factores de virulência e patogenicidade foram identificados, como tendo um papel importante nos mecanismos de colonização e infecções por estes microrganismos. Entre estes, destaca-se, a capacidade de se manterem viáveis por longos períodos de tempo, a capacidade de adquirirem nutrientes essenciais, a adesão a células epiteliais levando à sua apoptose, e a secreção de produtos tóxicos que causam danos nos tecidos. A formação de um biofilme, facilitando a adesão

bacteriana a materiais de plástico, como cateteres e tubos de ventilação mecânica, favorece a colonização e infecção dos pacientes. Além disso, a interação dos pili bacterianos e dos lipopolissacarídeos, promovem a adesão às células hospedeiras colonizando-as. Os lipopolissacarídeos têm sido, por isso, apontados como principais componentes na estimulação do sistema imune levando a uma resposta de inflamação nos casos de pneumonias (Lee, H, *et al.*, 2008, Rodriguez-Bano, J, *et al.*, 2008).

Assim, como factores de risco para a colonização destas espécies multirresistentes estão o prolongado tempo de internamento, exposição aos cuidados de saúde intensivos, ventilação mecânica, exposição aos agentes antimicrobianos, cirurgias recentes, procedimentos invasivos e doenças subjacentes severas. A contaminação generalizada do ambiente é outro factor associado, estando ainda os surtos de infecções por estes agentes associados aos equipamentos utilizados nos cuidados respiratórios. Contudo, os procedimentos utilizados pelos profissionais de saúde parecem estar amplamente ligados às elevadas taxas de colonização / infecção, sendo por isso de extrema importância o estabelecimento de regras para o controlo e prevenção da colonização. Deste modo, deverá melhorar-se a higienização das mãos dos profissionais de saúde, assim como dos equipamentos utilizados pelos mesmos, e promover as desinfecções e limpeza dos locais associados aos surtos. Existem ainda múltiplas intervenções que poderão ser realizadas no controlo dos surtos em unidades de cuidados intensivos sendo estas, no entanto, de maior dificuldade (Maragakis, L, Perl, , 2008).

Alarmante também é o estudo realizado por Perez e colaboradores (Perez, *et al.*, 2008), que mostrou a redução do efeito bactericida dos desinfectantes hospitalares contra *A. baumannii*, o que veio desafiar as abordagens convencionais no controlo das infecções e colonização ambiental(Perez, F, *et al.*, 2008).

1.1.2.3 Manifestações Clínicas

Dentro do género *Acinetobacter*, a espécie *A. baumannii*, é a espécie que tem mais importância e impacto na clínica, tendo sido isolada a partir de produtos biológicos associados a vários tipos de infecções, tais como :

- Bacteremias/ Septicémias;
- Pneumonias;
- Infecções da pele;
- Infecções do tracto urinário;
- Endocardites;

- Meningites (Bergogne-Bérezin, E, Towner, K, 1996).

Contudo, apesar do local de infecção por *A. baumannii* não diferir muito dos locais de infecção por outras bactérias de Gram-negativo, não é possível avaliar correctamente a frequência de infecções hospitalares por esta espécie, devido à dificuldade em distinguir entre colonização e infecção. Assim, o isolamento destes microrganismos a partir dos vários produtos, não são sinal necessariamente de infecção, pois, devido à sua elevada capacidade de adesão e variabilidade nutricional, podemos estar perante uma colonização (Gordon, N, Wareham, D, 2010).

Apesar disso, vários estudos relatam que os principais locais de infecção são:

i. Infecções do tracto respiratório

Actualmente, a pneumonia nosocomial é a infecção mais importante e com maior taxa de mortalidade associada, causada por *A. baumannii*, especialmente desde a aplicação de procedimentos de ventilação mecânica (Joly-Guillou, M, 2005).

Vários estudos relataram que *A. baumannii* é responsável por 3-5% das pneumonias nosocomiais, e tem emergido como uma importante complicação da ventilação mecânica (Peleg, A, *et al.*, 2008, Bergogne-Berezin, E, Towner, K, 2006), especialmente em indivíduos que se encontram nos cuidados intensivos, e sujeitos a este tipo de ventilação (15-24% das pneumonias ocorridas) (Peleg, A, *et al.*, 2008).

Existem ainda outros factores como idade, doença pulmonar crónica associada, imunossupressão, cirurgias associadas, uso de antimicrobianos e presença de dispositivos invasivos, que aumentam o risco de adquirir uma pneumonia nosocomial (Bergogne-Berezin, E, Towner, K, 2006).

Recentemente, também houve relatos de pneumonia adquirida na comunidade, principalmente nas regiões tropicais da Austrália e da Ásia. Esta infecção tem sido associada a uma elevada taxa de mortalidade e ocorre geralmente durante as estações chuvosas, entre indivíduos doentes ou com hábitos tabágicos e abuso de álcool (Falagas, M, *et al.*, 2007, Peleg, A, *et al.*, 2008).

ii. Bacteremias

O sangue é um fluído estéril mas, a partir da drenagem de um foco de infecção ou a partir de dispositivos intravenosos contaminados, tais como catéteres, algumas bactérias podem invadir a corrente sanguínea, levando ao aparecimento de bacterémias (Weinstein, *et al.*, 1997). A bacteremia constitui um sério problema de saúde associado à alta morbilidade e mortalidade (Yoshida, *et al.*, 2005), podendo ser classificada de acordo com o local de aquisição como comunitária, associada a cuidados hospitalares/ambulatoriais e nosocomial (Siegman-Igra, *et al.*, 2002). Em alguns casos e em certas condições algumas bactérias podem progredir e invadir todo o organismo originando septicémia, um sério problema de saúde associado a alta mortalidade (Bryan, 1991).

Assim, pode ocorrer em pacientes predispostos, após procedimentos clínicos invasivos, ou a factores associados ao mau prognóstico como doença grave subjacente, pneumonia, choque séptico, coagulação intravascular disseminada, ventilação mecânica e terapia antimicrobiana inadequada (Cisneros, J, Rodriguez-Bano, J, 2002).

iii. Meningite

Este tipo de infecção tem sido associada a indivíduos adultos submetidos a punção lombar ou procedimentos neurocirúrgicos. O principal factor de risco é a presença de catéteres ventriculares. A mortalidade pode ser tão alta quanto 70%, embora a verdadeira causa da morte seja geralmente difícil de determinar (Peleg, A, *et al.*, 2008).

iv. Infecções do tracto urinário

Infecções urinárias são raras e ocorrem principalmente em pacientes idosos debilitados, ou com catéteres urinários permanentes (algália). O isolamento de *A. baumannii* na urina nem sempre está associado a infecção pois, em indivíduos algaliados a uretra pode estar colonizada por estes microrganismos (Peleg, A, *et al.*, 2008).

1.1.2.4 Isolamento e identificação

As espécies de *Acinetobacter* são aeróbias estritas, crescendo bem numa variedade

de meios de cultura sólidos, utilizados frequentemente nas rotinas diárias dos laboratórios de microbiologia, como, por exemplo, gelose de sangue, um meio não selectivo, e meio de MacConkey agar, um meio selectivo e diferencial. São ainda, classificados como sendo bacilos de Gram-negativo (Figura 2), catalase positiva, oxidase negativa, imóveis, não fermentadores da lactose e reductores de nitratos. Relativamente às características morfológicas das culturas, podem apresentar-se mucóides e em meios selectivos diferenciais como meio de MacConkey agar, utilizado no presente estudo, é possível diferenciar os microrganismos que fermentam a lactose dos que não fermentam (Peleg, A, *et al.*, 2008). Assim, as bactérias lactose positiva originam colónias rosas ou vermelhas, e as colónias não fermentadoras dão origem a colónias incolores ou ligeiramente beges (Figura 2). A selectividade em relação às bactérias de Gram-positivo é proporcionada pelos sais biliares e o cristal violeta (Biomérieux, 2003).

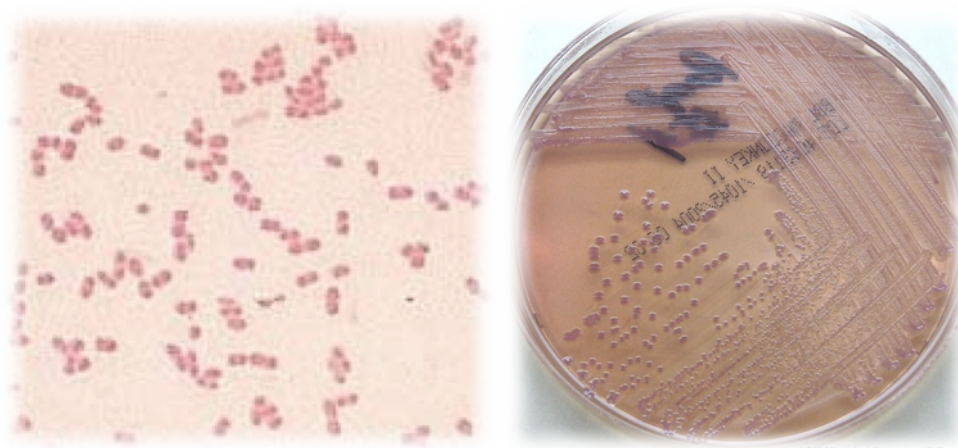


Figura 2: A figura ilustra a espécie de *Acinetobacter baumannii* ao microscópio e as respectivas colónias em meio de MacConkey agar.

1.1.2.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)

O conhecimento do padrão de sensibilidade à terapêutica antimicrobiana é fundamental para conhecer o perfil de susceptibilidade ou resistência das bactérias. Existem diversas técnicas para determinar o antibiograma das bactérias, no entanto, todas elas se baseiam na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro* na presença de diferentes gradientes de concentração de antibióticos (Sousa, J, Ferreira, W, 1998).

Assim, podemos conhecer o antibiograma de uma determinada bactéria, aplicando uma das seguintes metodologias:

- **Métodos de diluição:** Podem ser realizados em meio líquido ou sólido, e permitem determinar a concentração mínima inibitória (CMI) a um dado antibiótico em mg/L. Também é possível determinar para alguns antibióticos a concentração mínima bactericida (CMB). É um teste quantitativo.
- **Métodos de difusão em meio sólido pela técnica de Kirby-Bauer (KB):** Categoriza o microrganismo em Sensível, Intermédio e Resistente, em relação a um dado antibiótico. É um teste qualitativo.
- **E-Test:** Permite quantificar a actividade microbiana perante determinado antibiótico, determinando a CMI, através da técnica de difusão em meio de Muller-Hinton agar.
- **Métodos Automáticos (p.e. Sistema Vitek e Sistema Api):** Estes métodos podem ser quantitativos quando determinam a CMI, ou podem classificar os microrganismos em Sensível, Intermédio ou Resistente, e são qualitativos.

1.2 Antimicrobianos

Em 1928, Alexandre Fleming observou que o crescimento de colónias de *Staphylococcus aureus* era inibido aquando da presença de um fungo contaminante, *Penicillium notatum* (Hoff, B, *et al.*, 2008). Assim, Fleming concluiu que o fungo excretava uma substância antiestafilocócica, a penicilina, que era responsável pelo efeito bactericida (Fleming, A, 1929). Estava assim, descoberto o primeiro antibiótico, uma substância natural produzida por um fungo, dotada de propriedades antibacterianas que impediam o crescimento ou provocavam a morte celular (Sousa, JC, 2006). Posteriormente, numerosos antibióticos foram descobertos, desenvolvidos, comercializados e utilizados na terapêutica clínica, levando a uma grande diminuição da mortalidade humana associada a infecções bacterianas (Harbottle, H, *et al.*, 2006).

Contudo, apesar de, inicialmente, os antibióticos serem extremamente eficazes na remoção de bactérias patogénicas, fazendo mesmo acreditar-se que as doenças infecciosas

se tornariam um problema do passado (Aminov, R, 2009), verificou-se, que a utilização dos antibióticos em larga escala promoveu o aumento de espécies resistentes atingindo, sobretudo a nível hospitalar, valores preocupantes com o aparecimento de estirpes multirresistentes, o que veio dificultar as opções terapêuticas (ECDC, 2010).

Actualmente, as resistências aos antibióticos, são consideradas uma ameaça para a saúde pública, sendo por isso realizadas iniciativas nacionais e internacionais, que se focam numa consciencialização da prescrição de antibióticos, pois, diminuindo a utilização precoce de uma terapêutica antimicrobiana de largo espectro, reduzir-se-á a selecção de bactérias resistentes e consequentemente o número de resistências bacterianas (Butler, C, *et al.*, 2007). Assim, torna-se fulcral a realização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, de modo a beneficiar-se na monitorização e terapêutica dos pacientes, e na redução de bactérias multirresistentes (Harbottle, H, *et al.*, 2006).

Do ponto de vista molecular, os antimicrobianos de uso clínico exercem a sua acção em algumas das seguintes estruturas ou funções bacterianas:

- a) Inibição da síntese da parede bacteriana;
- b) Alteração da integridade da membrana citoplasmática;
- c) inibição da síntese proteica ou da síntese de ácidos nucleicos.

Há também outros antimicrobianos cuja função é impedir a acção de enzimas hidrolíticas bacterianas, como é o caso dos inibidores de β -lactamases (Tabela 1) (Calvo, J, Martínéz, L, 2009).

Tabela 1: Principais grupos de antimicrobianos e seus mecanismos de acção (adaptado de Calvo, J, *et al.* 2009) .

Mecanismo de acção	Grupos	Antimicrobianos representativos
Inibição da síntese da parede celular	β -lactâmicos	Penicilinas
		Naturais: Penicilina G e V Resistentes a penicilinas: Cloxacilina; Oxacilina; Meticilina Aminopenicilinas: Ampicilina; Amoxicilina Carboxipenicilinas: Carbenicilina; Ticarcilina Ureidopenicilinas: Piperacilina; Mezlocilina
		Cefalosporinas
		1ª Geração : Cefazolina; Cefalotina 2ª Geração : Cefuroxima; Cefoxitina; Cefotetan; Cefaclor; Cefamandol 3ª Geração : Cefotaxima; Ceftriaxona; Ceftadizima; Cefixima; Cefpodoxima 4ª Geração : Cefepima; Cefpiroma
		Monobactâmicos
		Aztreonam
		Carbapenemos
Alteração da membrana citoplasmática		Imipenemo; Meropenemo; Ertapenemo; Doripenemo
	Glucopéptidos	Vancomicina; Teicoplanina
	Bacitracina	Bacitracina
	Isoxazolidinonas	Cicloserina
	Fosfonopéptidos	Fosfomicina
	Polimixinas	Polimixina B; Polimixina E (Colistina)
	Lipopéptidos	Daptomicina
Inibição da síntese proteica	Ionóforos	Tiroticilina
	Formadores de poros	Gramicidinas
	Ácido fusídico	Ácido fusídico

	Aminoglicosídeos	Gentamicina; Tobramicina; Amicacina; Netilmicina
	Anfenicóis	Cloranfenicol; Tianfenicol
	Estreptograminas	Quinusprina - Dalfopristina
	Lincosamidas	Clindamicina; Lincomicina
	Macrólidos	Eritromicina; Espiramicina e outros
	Mupirocina	Mupirocina
	Oxazolidinonas	Linezolid
	Tetraciclina	Tetraciclina; Minociclina
	Glicilinas	Tigeciclina
Alteração do metabolismo e da estrutura dos ácidos nucleicos	Quinolonas	1ª Geração : Ácido nalixídico; Ácido pipemídico
		2ª Geração : Norfloxacin
		3ª Geração : Ciprofloxacina; Levofloxacina
		4ª Geração : Moxifloxacina; Gemifloxacina
	Rifampicinas	Rifampicina
	Nitroimidazoles	Metronidazole; Ornidazole; Tinidazole
	Nitrofuranos	Nitrofurantoina; Furazotidona
Bloqueio da síntese dos factores metabólicos	Trimetropim	Cotrimoxazol
	Sulfonamidas	
Inibidores das β -lactamases	Diaminoprimidina	Sulfametoxazol
		Ácido clavulânico;
		Sulbactam; Tazobactam

Atendendo ao efeito antimicrobiano, os antibióticos, podem ser classificados tradicionalmente em bactericidas, quando exercem uma acção letal na bactéria, ou bacteriostáticos, se inibem transitoriamente o crescimento bacteriano. No entanto, o mesmo antibiótico pode comportar-se como bactericida ou bacteriostático, dependendo da concentração utilizada e da sua afinidade para atingir o alvo. Em geral, são considerados bactericidas, os antimicrobianos que inibem a síntese da parede celular, que actuam de forma a alterar a membrana citoplasmática, ou que interferem no metabolismo celular dos ácidos nucleicos, e bacteriostáticos, os que inibem a síntese proteica, com excepção dos aminoglicosídeos (Calvo, J, Martínéz, L, 2009).

1.2.1 Antibióticos Inibidores da síntese da parede celular

A parede celular é uma estrutura que reveste externamente a célula bacteriana, de modo a garantir a integridade da célula bacteriana, pela capacidade de suportar diferenças de pressão osmótica. Assim, a ausência desta estrutura de protecção, poderia levar à destruição do microrganismo (Dover, L, *et al.*, 2007).

Deste modo, diversos antibióticos actuam nas diferentes fases da síntese da parede celular, que se desenrola em 3 etapas fundamentais:

- Fase citoplasmática, onde se sintetizam os precursores do peptidoglicano;
- Fase membranar, que compreende o transporte dos precursores, sintetizados anteriormente, através da membrana citoplasmática;
- Fase parietal, que corresponde à organização da estrutura final do peptidoglicano e

que se desenrola na parte mais externa da parede celular (Calvo, J, Martinez, L, 2009).

Somente os antibióticos inibidores da fase citoplasmática, têm necessidade de atravessar a membrana citoplasmática bacteriana, a fim de atingirem o seu alvo, como é o caso da cicloserina e fosfomicina. A vancomicina, ristocetina e bacitracina têm o seu alvo dentro da membrana citoplasmática, e os antibióticos β -lactâmicos têm o seu alvo no folheto externo da membrana citoplasmática, repercutindo-se na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano (Sousa, JC, 2006).

1.2.1.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos representam o grupo mais numeroso e com maior uso na clínica. A presença de um anel β -lactâmico na sua estrutura, com um oxigénio na posição β , define quimicamente esta família de antibióticos. Assim, em função dos radicais que se unem a este anel distinguem-se vários sub-grupos dos quais se destacam: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Figura 3) (Asbel, L, Levinson, M, 2000). Dentro de cada sub-grupo, as pequenas alterações efectuadas na estrutura da molécula originam compostos com maior espectro antimicrobiano, contudo o aparecimento de resistências a estes compostos limita a sua utilização e a sua eficácia em determinadas situações (Suárez, C, Gudíol, F, 2009).

Os β -lactâmicos são antibióticos de actividade bactericida lenta, independentemente da concentração mínima do antimicrobiano que inibe o crescimento bacteriano.



Figura 3: A figura representa a estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado Suárez,C, Gudíol,F, 2009).

1.2.1.2 Mecanismo de acção

Os antibióticos β -lactâmicos são agentes bactericidas, realizando a sua acção através de dois mecanismos fundamentais: (i) inibição da síntese da parede bacteriana e (ii) indução da autólise bacteriana. A parede bacteriana é uma estrutura que envolve as bactérias, excepto o *Mycoplasma*, e que é composta principalmente, por uma proteína designada peptidoglicano. O esqueleto do peptidoglicano é constituído por largas cadeias de glícidos, formadas pela repetição da molécula N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina. Por sua vez, o ácido murâmico liga-se a cadeia de tetrapeptídios que se unem entre si formando uma malha. Os diferentes componentes do peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana citoplasmática para o espaço periplasmático.

A última fase da síntese do peptidoglicano é a formação de tetrapéptidos, pela perda de um dos aminoácidos terminais por acção das enzimas que se localizam no espaço periplasmático, as transpeptidases, processo designado de transpeptidação (Figura 4). O anel β -lactâmico apresenta uma estrutura semelhante à região onde se ligam estas enzimas, sendo capaz de se unir covalentemente às enzimas e impedir a formação da parede celular. Por esta razão as enzimas designam-se de PBP's (Penicilin Binding Proteins) (Figura 5).

Assim é de salientar que para que os β -lactâmicos actuem é necessário que a bactéria se encontre em multiplicação, e que esteja no momento em que sintetiza a parede celular. Estes compostos também actuam activando uma autolisina endógena bacteriana que destrói o peptidoglicano, como foi referido anteriormente (Suárez, C, Gudiol, F, 2009).

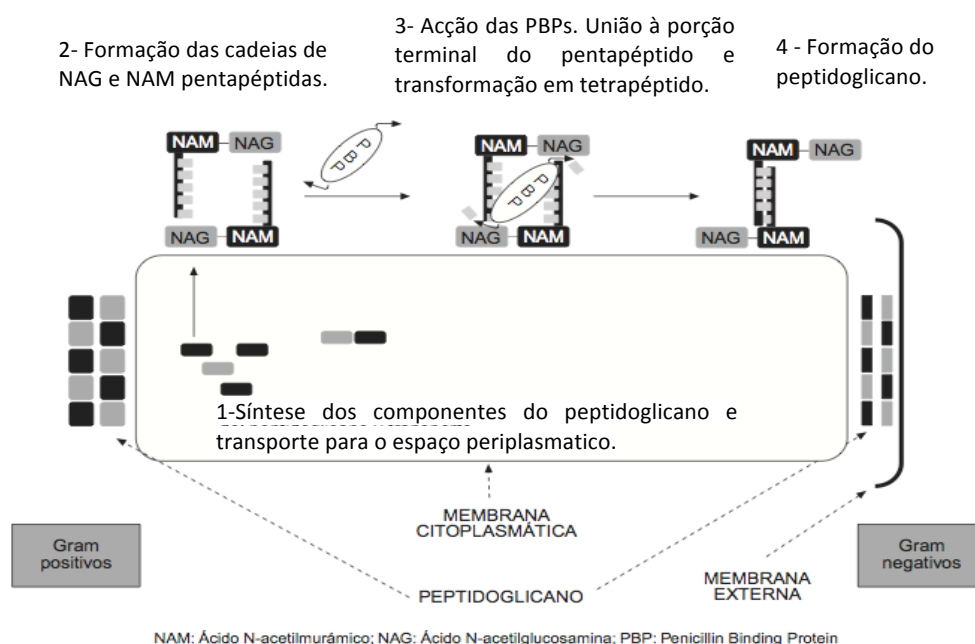


Figura 4: Resumo das etapas de formação da parede celular (adaptado de Suárez,C, Gudiol,F, 2009).

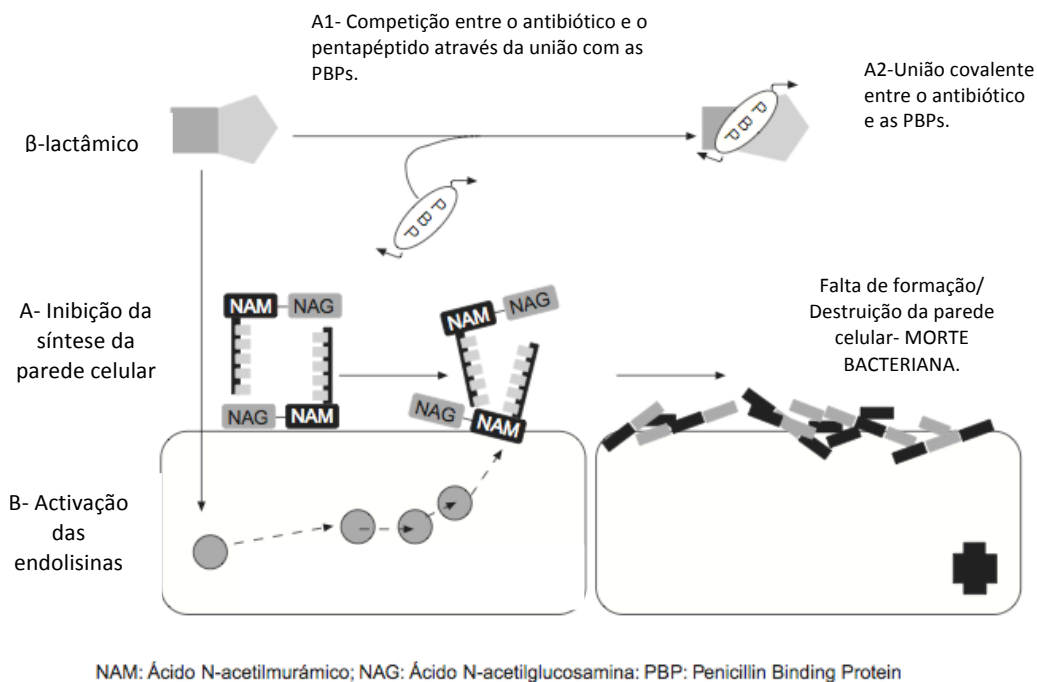


Figura 5: Ilustração do mecanismo de acção dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Suárez,C, Gudíol,F, 2009).

1.2.1.3 Mecanismos de resistência

As bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência aos β -lactâmicos através de quatro processos diferentes:

- **Produção de enzimas**, designadas β -lactamases, que podem ter origem plasmídica ou cromossomal que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inactivando o antibiótico antes da sua união às PBP's. Este é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos, especialmente em bactérias de Gram Negativo.

A produção destas enzimas pode ser mediada por plasmídeos ou serem codificadas no cromossoma. No entanto, existem muitos tipos de β -lactamases consoante o tipo os β -lactâmicos que hidrolisam, sendo muitas vezes designadas de penicilinasas, cefalosporinasas e carbapenemases. O uso destes antibióticos, durante décadas favoreceu ainda o aparecimento das β -lactamases de largo espectro (ESBLs) (Lee, N, *et al.*, 2001).

- **Modificação dos alvos (PBP's):** Neste mecanismo de resistência, ocorrem alterações nas PBP's através de mutações nos genes produtores de PBP's, hiperexpressões e modificações da afinidade, ou seja, síntese de novos PBP's sem grande afinidade para os β -lactâmicos, o que dificulta a ligação do antibiótico à proteína, diminuindo assim a actividade do mesmo. Este é o principal mecanismo de resistência utilizado pelas bactérias de Gram

positivo, especialmente em *S.aureus* e *S. pneumoniae* (Suaréz, C, Guadiol, F, 2009).

- **Alterações na permeabilidade da membrana:** A membrana celular, impõe uma barreira à passagem de algumas substâncias lipofílicas, como é o caso dos antibióticos β -lactâmicos, por isso são necessárias proteínas (porinas) que facilitem a entrada dos mesmos no espaço periplasmático de modo a unirem-se com as PBP's e dessa forma exercerem a sua acção. Deste modo havendo alterações na permeabilidade, a bactéria torna-se resistente à acção dos antibióticos (Poole, K, 2005).

- **Presença de Bombas de efluxo:** Algumas bactérias apresentam sistemas que bombeiam o antibiótico para o exterior, impedindo que este não atinja a concentração intracelular necessária para inibir a síntese proteica da bactéria. Este mecanismo de resistência determina assim a resistência intrínseca utilizada contra muitos antibióticos (Suaréz, C, Guadiol, F, 2009).

1.2.2 Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos

O genoma bacteriano contém a informação necessária para a síntese de proteínas. Essa informação transmite-se através de um processo designado transcrição, onde mRNA produzido a partir de uma cadeia molde de DNA, transporta a informação para a síntese de proteínas e de rRNA que fará parte dos ribossomas bacterianos. Posteriormente a informação do DNA deve ser duplicada, durante a divisão da bactéria, de modo a assegurar a viabilidade da célula e da sua descendência. A replicação e transcrição do DNA realiza-se através de várias fases e com a participação de diferentes enzimas e substratos, que constituem por sua vez alvos para acção de diversos antibióticos.

Dentro deste grupo incluem-se: as rifamicinas e quinolonas, que actuam em enzimas que participam nos processos de transcrição e replicação, e os nitromidazóis e nitrofuranos que actuam directamente sobre o DNA, danificando-o.

A maioria dos antibióticos deste grupo que actuam sobre o DNA, são rápidos bactericidas (Calvo, J, Martinez, L, 2009).

1.2.2.1 Quinolonas

As quinolonas (Figura6), antibióticos de síntese química, foram descobertos acidentalmente em 1958, quando se observou que um produto secundário da síntese de cloroquina, a 7-cloroquinolina, tinha propriedades bactericidas. Posteriormente, o ácido

nalidíxico (7- cloroquinolona) começou a ser muito usado na terapêutica clínica dando origem a uma grande quantidade de componentes deste grupo terapêutico (Rada, B, *et al.*, 1998). Actualmente, estes fármacos juntamente com os β -lactâmicos, constituem os antibióticos mais utilizados em terapêutica. Deste modo, as quinolonas são classificadas em diferentes gerações, consoante o seu espectro de acção e as suas propriedades farmacocinéticas (Calvo, J, Martinez, L, 2009).

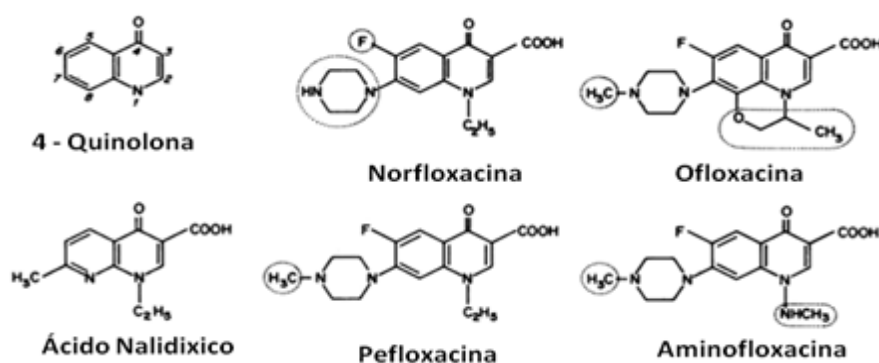


Figura 6: Representação da estrutura química básica das Quinolonas, de onde resultam diferentes gerações de quinolonas.

1.2.2.2 Mecanismo de acção

Este grupo de antibióticos penetra no interior da bactéria através de porinas existentes na membrana citoplasmática, e destroem as ligações entre os lipopolissacarídeos da membrana, aumentando desta forma a permeabilidade da célula bacteriana.

Actuam ao nível da DNA girase, enzima responsável pelo enrolamento das cadeias do DNA, e pela separação e ruptura das ligações entre os nucleótidos (de modo a permitir a transcrição e replicação do DNA). As quinolonas inibem a síntese do DNA por se ligarem a duas enzimas relacionadas, mas funcionalmente diferentes, a DNA girase (topoisomerase tipo II) e a topoisomerase tipo IV. A DNA girase é o principal alvo nas bactérias de Gram Negativo e a topoisomerase IV é o alvo preferencial em bactérias de Gram Positivo (Fluit, A, 2001).

A enzima DNA girase é composta, nas bactérias, por duas subunidades A, codificadas pelo gene *gyrA*, e duas subunidades B codificadas pelo gene *gyrB*, e tem como função alterar a configuração da dupla cadeia de DNA dentro da célula. A inibição da sua actividade pelas quinolonas está associada com a morte da célula bacteriana (Fluit, A, 2001).

As quinolonas ao ligarem-se ao complexo formado pela DNA girase vão interferir de forma directa com o processo de superenrolamento negativo do DNA. Ao impedir o

superenrolamento, o DNA perde a sua estrutura e não tem espaço suficiente no interior da célula. A célula adquire um aspecto filamentoso e sofre lise pelas suas próprias autolisinas (Rada, B, *et al.*, 1998).

1.2.2.3 Mecanismos de Resistência

Algumas bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência à acção das quinolonas, por um dos seguintes mecanismos:

- **Alteração da DNA girase:** Esta alteração é um factor importante de resistência, e consiste na alteração de alguns dos aminoácidos nas posições 67 a 106. Diferentes mutações a este nível impedem que as quinolonas se liguem às enzimas bacterianas.

- **Impermeabilização da membrana externa:** A impermeabilidade bacteriana poderá ser devida à diminuição de algum tipo de proteínas da membrana externa, ou devida à modificação dos lipopolissacarídeos da membrana com consequente alteração das porinas, impedindo assim a entrada destes antibióticos. Este mecanismo afecta unicamente as bactérias de Gram Negativo.

- **Bombas de efluxo:** Algumas bactérias expulsam de forma activa as quinolonas do seu interior. Desta forma o antibiótico não conseguirá atingir a concentração necessária para destruir a bactéria. Este mecanismo existe em bactérias de Gram - Positivo e de Gram - Negativo (Rosenstiel, N, Adam, D, 1994).

- **Mutações cromossómicas:** A maior parte das resistências a este grupo de antibióticos faz-se por este mecanismo. (Rada, B, *et al.*, 1998).

1.2.3 Inibidores da síntese proteica

A síntese proteica é dos processos mais frequentemente afectado pela acção dos antibióticos e a sua inibição só é possível graças às diferenças estruturais entre os ribossomas bacterianos e eucariotas. O complexo ribossomal bacteriano é do tipo 70S, sendo formado por duas subunidades (30S e 50S) que contêm rRNA (rRNA 16S na subunidade 30S e rRNA 5S e 23S na subunidade 50S), para além de diversas proteínas, designadas de proteínas S, na subunidade 30S, e proteínas L, na subunidade 50S. Todas estas estruturas podem ser locais de ligação dos antibióticos.

A maior parte dos antibióticos deste grupo possuem uma actividade bacteriostática, excepto os aminoglicosídeos que se comportam como bactericidas.

A síntese proteica realiza-se mediante diferentes fases, nas quais actuam diferentes antibióticos. Assim existem inibidores da fase de activação (Mupirocina), inibidores do início síntese proteica (oxazilidinonas e aminoglicosídeos), inibidores da fixação do aminoacil – tRNA ao ribossoma (Tetraciclina e Gliciliclinas) e inibidores do alongamento (anfenicóis, lincosamidas, macrólidos, estreptograminas e ácido fusídico) (Calvo, J, Martínez, L, 2009).

1.2.3.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são um grupo de antibióticos que apresentam um espectro de acção alargado, que se distinguem pela sua acção bactericida e pela particular actividade contra bactérias aeróbias de Gram- Negativo (Shakil, S, *et al.*, 2008) (Figura 7).

A estreptomina, foi o primeiro fármaco deste grupo a ser introduzido, em 1944, seguido de uma série de compostos, a canamicina, gentamicina e tobramicina, de extrema importância no tratamento de infecções por bacilos de Gram-Negativo. (Leclercq, M, *et al.*, 1999).

Os aminoglicosídeos são bactericidas e a sua actividade sinérgica com outros antibióticos, torna-os uma mais-valia para o tratamento de doenças infecciosas (Pérez, J, *et al.*, 1998).

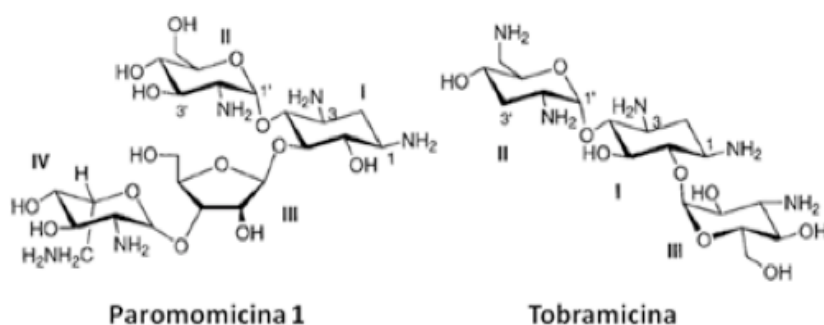


Figura 7: A figura representa a estrutura química de dois aminoglicosídeos.

1.2.3.2 Mecanismo de acção

Os aminoglicosídeos são bactericidas, uma vez que inibem a síntese proteica e actuam independentemente da fase em que se encontra a célula bacteriana.

Para exercer o seu efeito é necessário que o antibiótico entre na célula bacteriana, principalmente, por transporte activo (Leclercq, M, *et al.*, 1999).

Os aminoglicosídeos são aminociclitolis que após penetrarem na célula bacteriana, matam a bactéria, inibindo a síntese proteica por se ligarem ao rRNA 16S, na subunidade 30S e interrompendo a integridade da membrana celular bacteriana (Shakil, S, *et al.*, 2008).

1.2.3.3 Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos incluem:

- Modificação enzimática;
- Redução da concentração intracelular deste composto por mudanças na permeabilidade da membrana externa;
- Bombas de efluxo;
- Alteração da subunidade ribossômica 30S por mutação;
- Metilação do local de ligação dos aminoglicosídeos (Managet, S, Blanchard, J, 2003).

1.2.4 Antibióticos antimetabolitos

Para obter determinados elementos essenciais como aminoácidos e as bases nucleotídicas (purinas e pirimidinas), é necessária a síntese de folatos, que algumas bactérias são incapazes de obter do meio. A síntese do ácido tetrahidrofólico (THF), obtém-se a partir de uma molécula de pteridina com ácido para-aminobenzóico (PABA), que por acção da enzima di-hidropteroato sintetase (DHPS) dá origem a um composto designado de ácido di-hidropteróico. Posteriormente, através da junção do ácido glutâmico, forma-se o ácido di-hidrofólico (DHF), que por sua vez, reduzido pela enzima di- hidrofolato redutase (DHFR) forma o ácido tetrahidrofólico (THF), o qual, vai dar origem a purinas e pirimidinas (Calvo, J, Martínez, L, 2009).

1.2.4.1 Sulfonamidas e Trimetoprim

O Trimetoprim (TMP) e as sulfonamidas (SULs) são agentes antimicrobianos sintéticos. Os componentes destes fármacos têm mecanismos de acção complementares que resultam no sinergismo da sua actividade (Kielhofner, M, 1990).

As sulfonamidas (SULs) foram introduzidas na clínica em 1932 e o trimetoprim (TMP) foi introduzido em 1962 e a sua combinação, Sulfametoxazol – Trimetoprim (SxT) ou

cotrimoxazol, teve início em 1968, quando foi descrito, o aumento da actividade de sulfametoxazol combinado com trimetoprim (Huovinen, P, *et al.*, 1995).

As SULs administradas isoladamente têm um efeito bacteriostático, enquanto que a combinação SxT tem um efeito bactericida devido ao seu efeito sinérgico (Kielhofner, M, 1990). A sua estrutura é evidenciada na Figura 8.

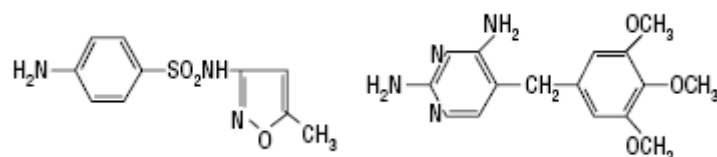


Figura 8: A figura esquematiza a estrutura do Sulfametoxazol e Trimetoprim, respectivamente (Masters, P, 2003).

1.2.4.2 Mecanismo de acção

As sulfonamidas são análogas ao ácido para-aminobenzóico (PABA), e por isso, competem com as enzimas di-hidropteroato sintetase (DHPS), impedindo a formação do ácido di-hidropteróico, precursor do ácido fólico - Figura 9.

O Trimetoprim compete com a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) evitando a conversão do ácido di-hidrofólico (DHF) em ácido tetrahidrofólico (THF) – Figura 9 (Calvo, J, Martínez, L, 2009).

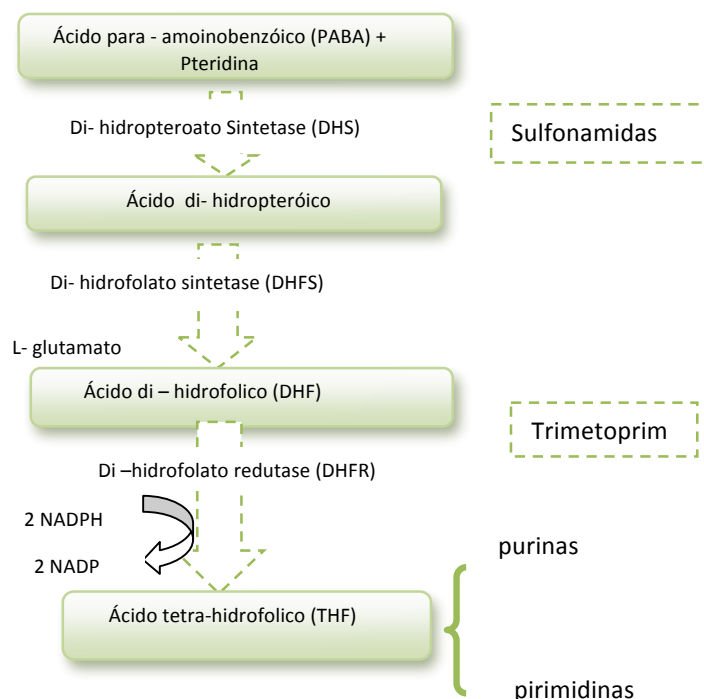


Figura 9: Via metabólica para a síntese dos cofactores folato e locais de acção dos antibióticos sulfonamidas e trimetoprim.

1.2.4.3 Mecanismos de resistência

Apesar da eficácia e dos baixos custos destes compostos, durante as últimas décadas, foram aumentando as resistências a estes antibióticos. Assim, as bactérias podem tornar-se resistentes as sulfonamidas e trimetoprim por vários mecanismos:

- Impermeabilidade da membrana;
- Bombas de efluxo;
- Modificações nos locais de ligação às enzimas;
- Desregulação da expressão dos genes que codificam as enzimas alvo (Masters, P, *et al.*, 2003).

1.3 Resistência Bacteriana: papel dos elementos genéticos móveis

Actualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos, constitui um sério problema de saúde pública nível mundial. Assim, a resistência antimicrobiana pode ser natural ou intrínseca, quando faz parte das características naturais e fenotípicas do microrganismo. Neste caso, a resistência é transmitida apenas verticalmente de geração em geração, fazendo parte da herança genética do microrganismo. A condicionante principal neste tipo de resistência é a presença ou ausência do alvo para acção do antibiótico.

Contudo, na maioria dos casos, a resistência é adquirida, por mutação ou recombinação genética. Este tipo de resistência ocorre quando uma espécie inicialmente susceptível a um determinado antibiótico, se torna resistente a esse mesmo composto. Assim, essa nova característica, ausente nas células progenitoras, resulta de alterações genéticas cromossómicas (mutações), ou da aquisição de estruturas extrínsecas, como plasmídeos contendo genes de resistência (Martínez, J, Baquero, F, 2002).

1.3.1 Transferência de genes

A transferência de genes de resistência ocorre quando um dado microrganismo recebe material genético de outro microrganismo, passando a expressar a característica contida no gene recentemente adquirido. Esse material genético, que contém a informação que expressa a resistência, pode ser transferido por transformação, transdução e conjugação (Summers, A, 2006).

1.3.1.1 Transformação

Este é um processo de incorporação de um DNA exógeno proveniente da lise de um determinado microrganismo com libertação do seu material genético. Esse DNA pode ser originário do cromossoma, de plasmídeos ou ainda de bacteriófagos, e para que ocorra esse processo a bactéria receptora tem de estar apta a receber esse material (Summers, A, 2006) (Figura 10 III).

1.3.1.2 Transdução

Ocorre quando há movimento de genes de uma bactéria “dadora” para uma bactéria receptora através de um vector, o bacteriófago. Envolve a incorporação acidental do DNA bacteriano cromossômico ou plasmídico por um bacteriófago durante o processo de infecção celular (Griffiths, A, *et al.* 1999) (Figura 10 I).

1.3.1.3 Conjugação

É um processo que requer contacto entre bactérias, em que uma das bactérias actua como dadora, transferindo através de um pilus sexual o seu material genético para uma bactéria receptora (Summers, A, 2006) (Figura 10 II).

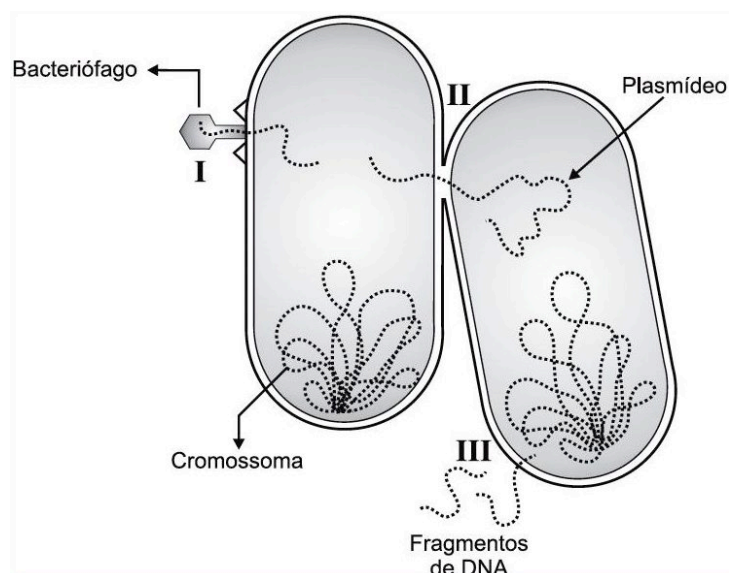


Figura 10: Representação esquemática das diferentes formas de transferência de genes entre bactérias. I: Transdução, II: Conjugação e III: Transformação.

1.3.2 Elementos genéticos móveis

Os elementos Genéticos Móveis são segmentos de DNA que codificam enzimas e outras proteínas que mediam a movimentação do DNA dentro de genomas (mobilidade intracelular) ou entre bactérias (mobilidade intercelular). Assim, a mobilidade genética torna possível a fácil e rápida disseminação dos genes de resistência às diferentes classes de antibióticos. São determinantes para este fenómeno a existência de estruturas móveis bacterianas, tais como plasmídeos, sequências de inserção (SI), transposões e integrões que transportam determinantes genéticos de resistência.

1.3.2.1 Plasmídeos

Pequenas moléculas circulares de cadeia dupla de DNA extra- cromossômico, que possuem a capacidade de replicação autónoma, e que apesar de não serem essenciais para o crescimento bacteriano, fornecem à célula vantagens adicionais em determinadas condições ambientais, por serem importantes veículos de transporte e mobilização de genes (Martínez, J, Baquero, F, 2002).

Além de transportarem genes de resistência, os plasmídeos podem servir como veículos para outros elementos genéticos móveis, como os transposões e integrões (Harbottle, H, *et al.*, 2006) (Figura 11).

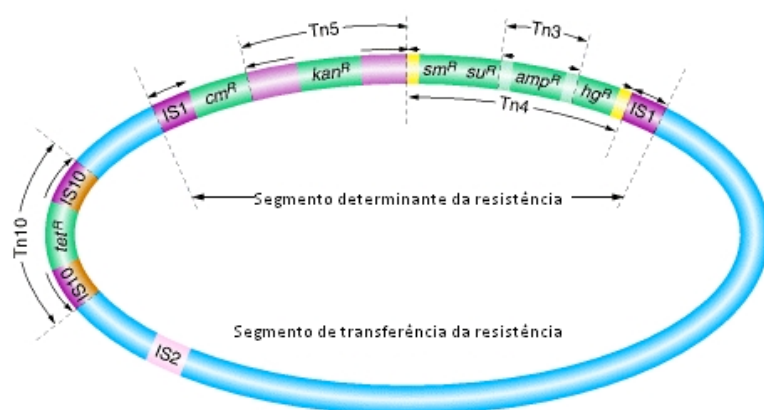


Figura 11: Representação esquemática de um plasmídeo.

1.3.2.2 Sequências de inserção

Na sua constituição apresentam um gene que codifica a enzima transposase,

flanqueado por curtas sequências nucleotídicas invertidas nos extremos. A transposase reconhece as sequências invertidas e as repetições idênticas noutros locais do cromossoma, fazendo a excisão e inserção destes fragmentos de DNA do local original para outro novo local de DNA, promovendo, desta forma, a transferência de genes de resistência a antibióticos.

Normalmente quando os elementos de inserção são inseridos entre os genes, interrompem a sua sequência codificante e inativam a expressão desse gene, conferindo a resistência ao antibiótico (Wagner, A, 2006)

1.3.2.3 Transposões

Os transposões são elementos genéticos móveis que necessitam de bacteriófagos ou mais frequentemente de plasmídeos para poderem ser transferidos de uma célula para outra. Contêm vários genes, de resistência aos antibióticos, flanqueados por duas Sequências de Inserção (SI). Os genes presentes no transposão podem mover-se dentro do cromossoma, do plasmídeo para o cromossoma, do cromossoma para o plasmídeo e entre plasmídeos, sendo este movimento sempre mediado pela enzima transposase (Martínéz, J, Baquero, F, 2002).

1.3.2.4 Integções

São uma família de elementos genéticos potencialmente móveis, capazes de integrar e expressar genes de resistência aos antibióticos. São encontrados principalmente em bactérias de Gram-Negativo, nomeadamente, em *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.

O integrão é composto por duas sequências conservadas, e por uma região variável.

A primeira região conservada, também designada segmento conservado 5' (CS-5'), é constituído pelo gene *intI* que codifica a enzima integrase, e o gene *attI*, local que permite a recombinação do integrão com as cassetes genéticas, e a sua posterior integração. Entre o gene *intI* e o local de recombinação *attI* encontram-se os promotores divergentes *P1* para a expressão da integrase, e o promotor *Pc* para a expressão das cassetes de genes inseridas na zona variável do integrão. O gene *intI* permite a interacção entre o local *attI* e o local *attC* das cassetes de genes, unindo ambos os sítios e facilitando a integração e a excisão das cassetes de resistência na zona variável do integrão (Bennett, P, 1999).

A região variável é composta por cassetes genéticas, que são pequenos elementos circulares de DNA com uma região codificante que confere resistência aos antibióticos,

gene, e um local de recombinação específico *attC* no extremo 3'. As cassetes não são móveis autonomamente, e a interacção entre *attC* e *attI* é mediada pela enzima integrase. O promotor *Pc* permite a transcrição sequencial das cassetes genéticas inseridas no integrão (Bennett, P, 1999) – figura 12 e 13.

Na segunda região conservada, ou segmento conservado 3' (CS-3'), estão presentes genes que conferem, respectivamente, resistência aos compostos de amónio quaternário (*qacEΔ1*), e às sulfonamidas (*sul1*). Normalmente, em integrões que pertencem à classe 1, estes dois genes encontram-se fundidos, mas excepções têm sido encontradas. Estudos realizados por Walsh et al. (2005), mostraram que esta região poderia ser delectada, caso se tornasse um gasto supérfluo para a célula bacteriana, e por isso, em detrimento desta região, foram encontrados genes correspondentes ao Tn402 (genes *tniC*, *B*, *A*), a jusante da região variável.

Ainda em relação a este segmento conservado 3', diferentes estudos mostraram a presença de uma sequência de inserção, designada ISCR1, a jusante dos genes *qacEΔ1/sul1*. Esta sequência de inserção tem como finalidade a mobilidade dos genes que resistência a antibióticos que se encontram a montante, sendo finalizada por uma repetição do segmento conservado 3'. Perante esta constituição, é possível classificar este integrão como um integrão complexo de classe 1.

Os integrões podem ser divididos em dois grandes grupos: integrões de resistência e super-integrões. Os integrões de resistência, podem estar associados ao cromossoma ou a plasmídeos, e transportam cassetes genéticos que codificam resistência aos antibióticos (Fluit, A, 2004).

São conhecidas quatro classes de integrões de resistência, distinguíveis pelos genes que codificam para a integrase (*int*). A classe 1 é a mais abundante e a mais frequente em bactérias de Gram-negativo. A classe 4 é uma classe encontrada principalmente no genoma do *Vibrio cholerae* (Sabaté, M, 2002).



Figura 12: Esquematização da estrutura do integrão classe 1.

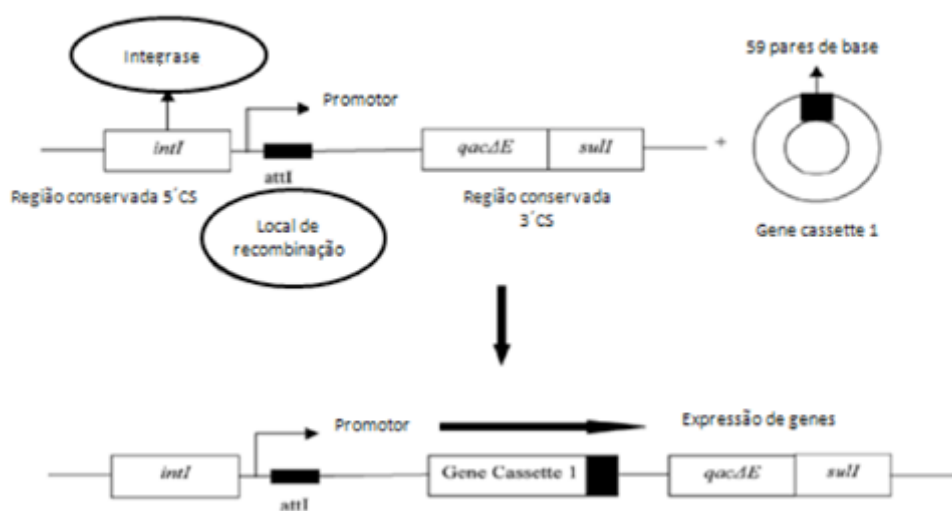


Figura 13: Esquematização da inserção de uma cassete de genes e do mecanismo de expressão dos genes associados a um integrase, imagem adaptada de Harbottle, H, *et al.*, 2006).

1.4 Genotipagem

A tipagem de microrganismos progrediu consideravelmente nos últimos anos, como resultado do desenvolvimento de técnicas moleculares que fazem uso da variação encontrada ao nível do genoma. A tipagem molecular permitiu não só grandes avanços nos domínios da identificação, classificação e diagnóstico, mas também no estudo da evolução e filogenia dos microrganismos (Vance, J, 2005).

Antes do desenvolvimento das diversas técnicas de tipagem molecular, os procedimentos que permitiam fazer a distinção dos isolados bacterianos baseavam-se em comparações fenóticas, ou seja, em testes morfológicos e bioquímicos, sensibilidade a fagos e bacteriocinas, perfis imunológicos e perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Apesar da sua grande utilidade na determinação do género e da espécie, a aplicabilidade destes métodos na tipagem ao nível da sub-espécie é muito limitada, pelo facto de caracterizarem o fenótipo e não o genótipo.

Os métodos de tipagem molecular permitem analisar uma parte ou a totalidade do genoma. Baseiam-se na comparação do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados a partir do genoma dos diferentes organismos. Assim, as abordagens mais importantes de tipagem molecular, baseadas na análise de ácidos nucleicos, podem dividir-se essencialmente em: (i) Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico, e (ii) Técnicas de tipagem baseadas em PCR (Hudson, T, *et al.* 2011).

A análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genómico consiste na digestão do DNA total com enzimas de restrição, originando fragmentos de diferentes tamanhos que formam diferentes padrões quando separados por electroforese, o que se designa de polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs - Restriction Fragment Length Polymorphisms). A técnica de RFLP's pode ser aplicada em DNA plasmídico, no qual, apenas uma pequena parte do genoma é analisado estando limitado às estirpes que contêm DNA plasmídico, e em DNA cromossomal, onde se encontra a totalidade da informação genética que é essencial em condições não selectivas.

As técnicas de tipagem baseadas em PCR são técnicas que permitem a obtenção de elevadas quantidades de uma dada sequência do DNA em estudo.

Existem vários métodos de tipagem baseados na técnica de PCR: (i) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), (ii) rep – PCR que inclui REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements), BOX (Repetitive Intergenic Sequence Elements of *Streptococcus*) e (iii) tipagem baseada em sequências nucleotídicas (forma de tipagem que combina a técnica de PCR com a de sequenciação).

O desenvolvimento da técnica de amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos por reacções de polimerização em cadeia, PCR, veio colmatar a dificuldade das análises efectuadas com pequenos fragmentos ou pequenas quantidades de DNA e permitir a tipagem rápida de muitos microrganismos. Tornou-se ainda uma ferramenta valiosa na identificação e classificação de bactérias (Singh, A, *et al.*, 2006).

2 Objectivos

Acinetobacter baumannii multirresistente é um patógeno nosocomial que, tal como já referido, emergiu mundialmente nas últimas décadas, afectando principalmente indivíduos que se encontram em unidades de cuidados intensivos, com doenças graves e após intervenções cirúrgicas. Este é também um microrganismo que tem a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo em condições adversas e que associado a sua facilidade em desenvolver / adquirir mecanismos de resistência aos antimicrobianos, constitui um sério problema de saúde pública.

Assim a colonização/ infecção por *Acinetobacter baumannii* contribui para o aumento da mortalidade e morbilidade, sendo de extrema importância a prevenção da colonização e infecção.

Deste modo, constituíram objectivos deste estudo:

- Avaliar a frequência de isolados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de todos os serviços hospitalares, do Hospital Infante D. Pedro - Aveiro;
- Verificar a clonalidade das estirpes de *Acinetobacter baumannii* isoladas no período de 1 de Novembro a 31 de Março;
- Conhecer o perfil de resistência das estirpes de *Acinetobacter*, isoladas a partir de amostras biológicas recolhidas dos pacientes, relacionando-o com a presença dos respectivos determinantes genéticos;
- Avaliar, por métodos moleculares, a presença de genes de resistência a antibióticos, associados ou não à presença de integroes e enzimas β -lactamases nos isolados seleccionados.
- Determinar os grupos de incompatibilidade dos plasmídeos presentes nos isolados recolhidos.

3 Material e métodos

3.1 Isolados bacterianos

No período de 1 de Novembro de 2010 a 31 de Março de 2011 foram recolhidos isolados de *Acinetobacter baumannii* de todos os produtos biológicos (p.e.: Urina, Sangue, Expectoração, Pus) que apresentavam exame bacteriológico positivo. Estes isolados foram recolhidos de produtos biológicos que deram entrada no Serviço de Patologia Clínica, na Secção de Microbiologia, de pacientes que se encontravam nos diversos serviços hospitalares do Hospital Infante D. Pedro – Aveiro.

Tendo em conta os perfis de resistência obtidos durante este período, foram seleccionados 47 isolados de *Acinetobacter baumannii* para o presente estudo.

A conservação das estirpes foi feita em meio de Tryptic Soy Broth (TSB), com adição de glicerol e armazenadas a -80°C.

3.2 Identificação dos isolados bacterianos

3.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica de execução obrigatória em Bacteriologia como primeiro passo na identificação das espécies bacterianas, dado o comportamento característico destas espécies.

Esta técnica tem um grande significado taxonómico pois permite distinguir bactérias de Gram-Positivo, de bactérias de Gram-Negativo. As bactérias de Gram-Positivo adquirem a cor arroxeada, conferida pelo primeiro corante (cristal de violeta); as bactérias de Gram-negativo, uma vez descoloradas pelo álcool-acetona, apresentam cor avermelhada, conferida pelo segundo corante (safranina). A constituição química e estrutural da parede celular das bactérias é a responsável por este diferente comportamento. As diferenças mais relevantes residem no facto das bactérias de Gram-Positivo apresentarem alto teor em peptidoglicano (50% a 90% do peso total da parede celular) e ausência de lipídeos, e das bactérias de Gram-Negativo apresentarem um elevado teor em lipídeos e baixa quantidade de peptidoglicano (apenas 10% do peso total da parede celular) (Figura 14) (Park, T, 2008).

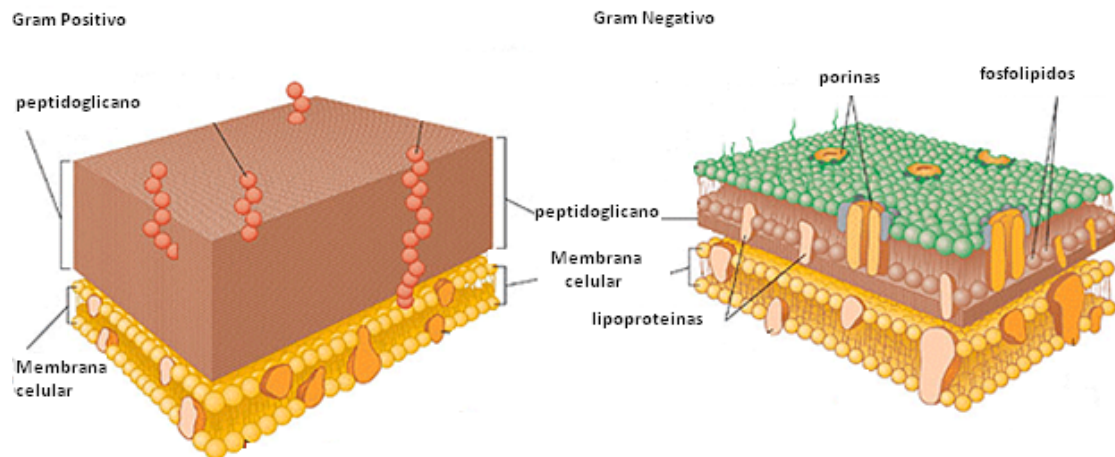


Figura 14: Esquematização das diferenças morfológicas entre a parede celular de bactérias de Gram-Positivo e de Gram-Negativo (adaptado de Alberts, B, *et al.*, 2001).

Esta coloração permite também visualizar a morfologia das bactérias e classificá-las em cocos ou bastonetes de Gram- Positivo ou de Gram- Negativo (Figura 15).

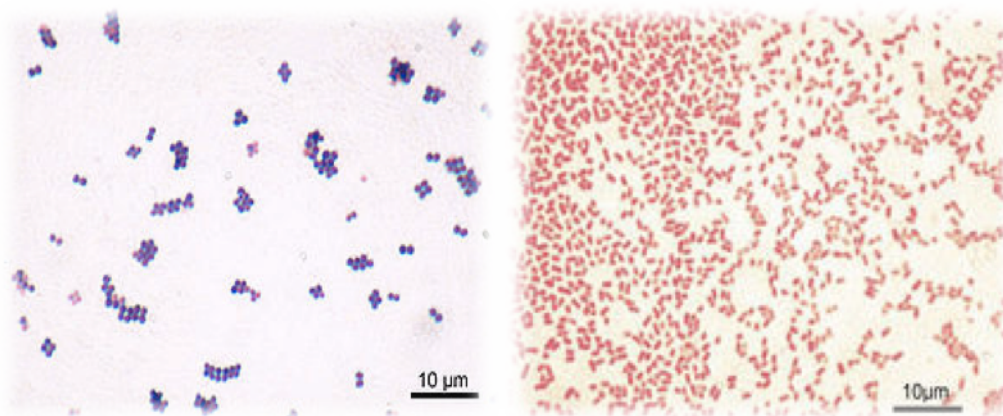


Figura 15: A figura ilustra a coloração de Gram : cocos de Gram-Positivo (esquerda) e bastonetes de Gram-Negativo (direita) .

3.2.1.1 Procedimento

1. Colocar sobre a lâmina uma gota de suspensão microbiana e realizar um esfregaço fino;
2. Secar e fixar pelo calor;
3. Cobrir o esfregaço com Violeta de cristal e deixar actuar durante 1 minuto;
4. Escorrer o corante e lavar com água corrente;
5. Remover o excesso de água e cobrir com Solutio de Lugol, deixando actuar durante 1 minuto;
6. Escorrer e lavar a preparação com álcool-acetona;

7. Lavar com água;
8. Cobrir o esfregaço com solução de Safranina durante 1 minuto;
9. Lavar com água e deixar secar;
10. Observar ao microscópio;
 - a. As bactérias coradas de roxo são designadas de Gram positivo;
 - b. As bactérias coradas de vermelho são designadas de Gram negativo.

3.2.1.2 Cultura em MacConkey agar

A gelose de MacConkey é um meio que, devido à sua composição, é simultaneamente selectivo e diferencial. A selectividade do meio é conferida em parte, pela sua constituição em sais biliares que inibem a maior parte das bactérias de Gram – Positivo, favorecendo assim o crescimento das bactérias de Gram negativo. O indicador de pH violeta de cristal, é outro constituinte do meio que lhe confere selectividade pela viragem do pH neutro do meio durante a fermentação da lactose. Assim, os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosas ou vermelhas e os que não fermentam originam colónias incolores ou ligeiramente beges (biomereux, 2003).

3.2.1.3 Identificação de *Acinetobacter baumannii* pelo método automático

A identificação automática realiza-se com o auxílio do equipamento Vitek2, que permite identificar bactérias e fungos leveduriformes.

O sistema Vitek 2, usado na identificação de microrganismos baseia-se em teste bioquímicos e utiliza cartas que contêm substratos liofilizados que são re-hidratados aquando da adição da suspensão bacteriana que se quer estudar. Para algumas cartas é necessário realizar alguns testes complementares, como a oxidase, catalase e coagulase, assim como, ter em conta alguns aspectos morfológicos, de forma a permitir a correcta identificação do microrganismo em causa (Figura 16). Depois de inoculada, a carta é colocada dentro do Leitor/Incubadora, o qual faz todas as leituras necessárias para permitir essa identificação.

A identificação das bactérias inicia-se com a coloração de Gram, uma vez que esta permite a diferenciação das bactérias em cocos ou bacilos de Gram- Positivo das que são cocos ou bastonetes de Gram- Negativo, sendo assim, necessário recorrer a outras provas complementares de modo a proceder-se à identificação da bactéria em questão.

3.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A determinação da sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) de *Acinetobacter baumannii* foi realizada com o auxílio do equipamento Vitek2.

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos, pelo sistema VITEK, são utilizadas cartas cujo princípio é baseado na técnica de microdiluição de concentração mínima inibitória (CMI). As cartas são constituídas por porções liofilizadas, pré-medidas e pesadas individualmente, de um agente antimicrobiano específico, combinado com meios de cultura microbiológicos. O inóculo realizado para a identificação do microrganismo é suficiente para a realização do antibiograma, por isso em cada identificação é realizado o respectivo antibiograma em simultâneo.

O sistema determina qual o poço que apresenta crescimento do microrganismo (positivo), com base na diminuição da intensidade de luz que é medida pelo leitor óptico.

É ainda notar que, para diferentes microrganismos existem suspensões diferentes. Assim, para bactérias de Gram-Positivo e bactérias de Gram - Negativo a suspensão deverá rondar os 0,50-0,63 na escala de MacFarland.

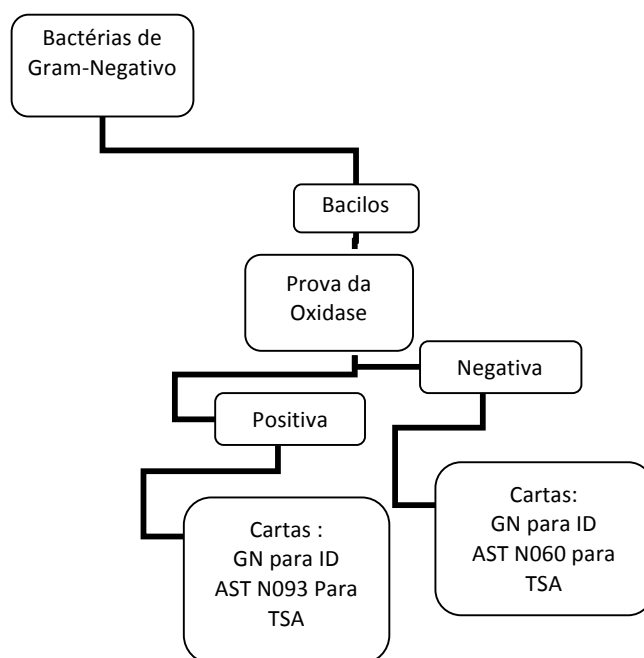


Figura 16: Esquematisação de Identificação/ TSA no sistema VITEK 2.

3.3.1 Antibióticos testados para *Acinetobacter baumannii*

Na Tabela 2 encontram-se os antibióticos testados para as estirpes de *Acinetobacter baumannii* na Secção de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica dos Hospital Infante D. Pedro:

Tabela 2: Antibióticos testados em *Acinetobacter baumannii*.

Grupo	Antibiótico
Polimixina E	Colistina
Penicilina	Ticarciclina ; Piperacilina
Monobactamicos	Aztreonam
Cefalosporinas	Cefepima; Ceftadizina
Carbapenemos	Imipenemo ; Meropenemo
Aminoglicosídeos	Isepamicina ; Amicacina; Tobramicina; Gentamicina
Quinolonas	Ciprofloxacina; Pefloxacina
Rifamicinas	Rifampicina
Tetraciclina	Minociclina
Cotrimoxazol	Sulfametoxazol + Trimetoprim
Antibiótico + inibidor	Ticarciclina + ácido clavulânico; Piperacilina+ Tazobactam

3.4 Amplificação de fragmentos de DNA por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

O estudo da clonalidade das estirpes assim como a presença de alguns genes de resistência foi realizado por PCR (Polimerase Chain Reaction). Para isso, efectuaram-se suspensões a partir das culturas em MacConkey com um período de incubação a 37°C de 18-24h.

Para preparação das suspensões, colocaram-se 3-5 colónias bacterianas puras em 30 µl de água destilada estéril, de forma a obter uma tonalidade baça. As suspensões foram aquecidas durante 10 minutos a uma temperatura de 100°C em banho seco. Desta suspensão foi utilizado 1µl para a reacção de PCR. As reacções de PCR foram preparadas como indicado na Tabela 3. Todas as reacções de PCR foram preparadas para um volume final de 12,5µl e decorreram num termociclador modelo C1000 Thermal Cycler da Bio – Rad.

Tabela 3: Reagentes e os respectivos volumes utilizados para uma reacção de PCR.

Reagentes	Volume para 1 reacção
25 mM MgCl ₂	1,5 µl
Buffer (5x)	2,5 µl
10 mM dNTP's	0,25 µl
DMSO	0,63 µl
dH ₂ O	6,8 µl
Primer R	0,38 µl
Primer F	0,38 µl
Taq polymerase (5U/ µl)	0,06 µl
DNA total ou suspensão aquecida	1 µl
	V _f = 13,5 µl

3.4.1 Pesquisa de Integções Classe 1

Para a pesquisa de integções classe 1 utilizaram-se os primers descritos na Tabela 4 e as condições de amplificação utilizadas encontram-se na Tabela 5.

Tabela 4: Sequência dos primers para pesquisa do gene codificante da integrase classe 1 (*Int 1*), das zonas variáveis (*Zv*) e tamanhos esperado dos respectivos fragmentos.

Designação do Primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência bibliográfica
HS 464	5'-ACATGCGTGTAAATCATCGTCG-3'	<i>Int1</i>	500bp	Barlow, R, et al., 2004)
HS 463a	5'-CTGGATTTCGATCACGGCACG-3'	<i>Int1</i>	500bp	
RB 317	5'-GAACCTTGACCGAACGCAG-3'	<i>Zv</i>	Variável	
RB 320	5'-AGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG-3'	<i>Zv</i>	Variável	

Tabela 5: Condições utilizadas nas reacções de amplificação do gene *Int1* e respectivas zonas variáveis.

Fases do PCR	Programa			
	Integrase classe 1		Zona Variável	
Desnaturação inicial	94°C	4'	94°C	4'
Desnaturação	94°C	30''	94°C	30''
Hibridação dos primers	65°C	30''	59°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	45''	72°C	3' 30''
Ciclos	30 ciclos		30 ciclos	
Síntese final	72°C	5'	72°C	10'

3.4.2 Pesquisa de Integrões de Classe 2 e 3

Para a pesquisa de integrões de classe 2 e de classe 3 utilizaram-se os primers descritos na Tabela 6 e as condições de amplificação utilizadas na Tabela 7.

Tabela 6: Sequência dos primers para pesquisa do gene codificante da integrase classe 2 e 3, e tamanhos dos respectivos fragmentos.

Designação do Primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência bibliográfica
RB 201	5'-GCAAACGCAAGCATTCTTA-3'	<i>Int2</i>	400bp	Moura, A, et al., 2007
RB 202	5'-ACGGATATGCGACAAAAGG-3'	<i>Int2</i>	400bp	
Int3 Rv	5'-AGTGGGTGGCGAATGAGTG-3'	<i>Int3</i>	450bp	
Int3 Fw	5'-TGTTCTGTATCGGCAGGTG-3'	<i>Int3</i>	450bp	

Tabela 7: Condições utilizadas nas reacções de amplificação do gene *Int2* e *Int3*.

Fases do PCR		Programa		
		Integrase classe 2		Integrase classe 2
Desnaturação inicial	94°C	4'	94°C	4'
Desnaturação	94°C	30''	94°C	30''
Hibridação dos primers	62°C	30''	58°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	45''	72°C	45''
Ciclos	30 ciclos		30 ciclos	
Síntese final	72°C	5'	72°C	5'

3.4.3 Pesquisa de elementos ISCR

Para a pesquisa de regiões comuns (ISCRs) utilizaram-se os primers descritos na Tabela 8 e as condições de amplificação utilizadas na Tabela 9.

Tabela 8: Sequência dos primers para pesquisa do gene codificante de CR, e tamanhos dos respectivos fragmentos.

Designação do Primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência bibliográfica
ISCR1 Fw	5'-ACTGACTCCCAGCCTGTCG-3'	<i>Segunda RV</i>	Variável	Santos, C, et al., 2010
RB 320	5'-AGCTTAGTAAAGCCCTCGTAG-3'	<i>Segunda RV</i>	Variável	

Tabela 9: Condições utilizadas nas reacções de amplificação da sequência CR.

Fases do PCR	Programa	
	CR	
Desnaturação inicial	94°C	4'
Desnaturação	94°C	30''
Hibridação dos primers	52,5°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	3' 30''
Ciclos	30 vezes	
Síntese final	72°C	10'

3.4.4 Pesquisa de genes que codificam para enzimas Beta-lactamases

Para a pesquisa de genes das enzimas beta-lactamases utilizaram-se os primers descritos na Tabela 10 e as condições de amplificação utilizadas na Tabela 11.

Tabela 10: Sequência dos primers para pesquisa dos diferentes genes que codificam para as enzimas beta-lactamases, e tamanhos esperado dos respectivos fragmentos.

Designação do Primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência bibliográfica
CTX Rv	5'-CGCAATATCATTGGTGGTGCC-3'	CTX	538bp	Henriques, I, <i>et al.</i> , 2006
CTX Fw	5'-GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG-3'	CTX	538bp	
SHV Rv	5'-GATTGGCGGCGCTGTTATCGC-3'	SHV	304bp	
SHV Fw	5'-GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC-3'	SHV	304bp	
OXA Rv	5'-AGTGTGTTTGAATGGTGATC-3'	OXA	814bp	
OXA Fw	5'-ACACAATACATATCAACTTCGC -3'	OXA	814bp	
TEM Rv	5'-TTTGGTATGGCTTCATTC-3'	TEM	425bp	
TEM Fw	5'-AAAGATGCTGAAGATCA-3'	TEM	425bp	
IMP Rv	5'-GTTTTAAYAAAACAACCACC-3'	IMP	232bp	
IMP Fw	5'-GAATAGAGTGGATTAATTCTC-3'	IMP	232bp	
VIM Rv	5'-GCCACGTTCCCGCAGACG-3'	VIM	475bp	
VIM Fw	5'-GATGGTGTGGTCGCATATCG-3'	VIM	475bp	
KPC Rv	5'-CGTTGACGCCAATCC-3'	KPC	800bp	Fontana, C, 2010
KPC Fw	5'-TGTCAGTATCGCCGTC-3'	KPC	800bp	Fontana, C, 2010
MOX Rv	5'-CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'	MOX	300bp	Perez-Perez, F, Hanson, N, 2002
MOX Fw	5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	MOX	300bp	
FOX Rv	5'-CAAAGCGCGTAACCGGATTGG-3'	FOX	190bp	
FOX Fw	5'-AACATGGGGTATCAGGGAGATG-3'	FOX	190bp	
DHA Rv	5'-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'	DHA	270bp	

DHA Fw	5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'	<i>DHA</i>	270bp	Perez-Perez, F, Hanson, N, 2002
ACC Rv	5'-TTCGCCGCAATCATCCCTAGC-3'	<i>ACC</i>	400bp	
ACC Fw	5'-AACAGCCTCAGCAGCTGGTTA-3'	<i>ACC</i>	400bp	
CMY Rv	5'-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'	<i>CMY</i>	500bp	
CMY Fw	5'-TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3'	<i>CMY</i>	500bp	

Tabela 11: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos genes das diferentes beta-lactamases.

Fases do PCR		Programa		
		CTX	SHV	
Desnaturação inicial	94°C	4'	94°C	4'
Desnaturação	94°C	30''	94°C	30''
Hibridação dos primers	55°C *	30''	62°C *	30''
Síntese das cadeias	72°C	45''	72°C	45''
Ciclos	30 vezes		30 vezes	
Síntese final	72°C	5'	72°C	5'

*As temperaturas de emparelhamento dos primers variam consoante o gene codificante a pesquisar; assim as temperaturas utilizadas são: OXA - 53°C; TEM - 44°C; MOX- 54,5°C; FOX - 57,5°C; CMY – 58,5°C; DHA - 61°C; ACC - 60°C; IMP - 55°C; VIM - 58°C; KPC - 48,5°C.

3.4.5 Pesquisa de genes *qnr*

Para a pesquisa dos genes *qnr A, B e S* utilizaram-se os primers descritos na Tabela 12, sendo as condições de amplificação utilizadas as que estão descritas na Tabela 13.

Tabela 12: Sequência dos primers para pesquisa dos genes *qnrA, B e S*, e tamanhos dos respectivos fragmentos.

Designação do Primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência bibliográfica
QnrA Rv	5'-GGCAGCACTATTACTCCCAA 3'	<i>qnrA</i>	600bp	Wu, J, et al., 2007
QnrA Fw	5'- TTCAGCAAGAGGATTCTCA-3'	<i>qnrA</i>	600bp	
QnrB Rv	5'-GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA -3'	<i>qnrB</i>	400bp	
QnrB Fw	5'-CCTGAGCGGCACTGAATTTAT -3'	<i>qnrB</i>	400bp	
QnrS Rv	5'-TCAGGATAAACAACAATACCC-3'	<i>qnrS</i>	600bp	
QnrS Fw	5'-CAATCATACATATCGGCACC-3'	<i>qnrS</i>	600bp	

Tabela 13: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos genes *qnrA*, *B* e *S*.

Fases do PCR	Programa			
	<i>qnrA</i>		<i>qnrB</i> e <i>S</i>	
Desnaturação inicial	94°C	4'	94°C	4'
Desnaturação	94°C	30''	94°C	30''
Hibridação dos primers	55°C	30''	60°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	45''	72°C	45''
Ciclos	30 ciclos		30 ciclos	
Síntese final	72°C	5'	72°C	5'

3.4.6 Pesquisa de grupos de Incompatibilidade de Plasmídeos.

Para a pesquisa de grupos de incompatibilidade a reacção foi preparada tal como descrito na Tabela 14 e utilizaram-se os primers descritos na Tabela 15. As condições de amplificação utilizadas são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 14: Reagentes e os respectivos volumes utilizados para uma reacção de multiplex de grupos de incompatibilidade.

Reagentes	Volume para 1 reacção
Buffer	1,25 µl
dNTP's	0,25 µl
dH ₂ O	3,45 µl
Primer R	1,25µl
Primer f	1,25µl
Primer R	1,25µl
Primer F	1,25µl
Primer R	1,25µl
Primer F	1,25µl
<i>Dream Taq</i>	0,05 µl
DNA total ou suspensão aquecida	1 µl
	V _f = 13,5 µl

Tabela 15: Sequência de primers utilizados no multiplex para a pesquisa de grupos de incompatibilidade de plasmídeos e os respectivos tamanhos do fragmentos.

Designação do Primer	Sequência	Gene a amplificar	Tamanho do fragmento	Referência bibliográfica
Y Rv	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT-3'	<i>repA</i>	765bp	Carattoli, A, et al. 2005
Y Fw	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	<i>repA</i>	765bp	
P Rv	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'	<i>iterons</i>	534bp	
P Fw	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	<i>iterons</i>	534bp	
FIC Rv	5'-TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT-3'	<i>repA2</i>	262bp	
FIC Fw	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3'	<i>repA2</i>	262bp	

Tabela 16: Condições utilizadas nas reacções de amplificação dos grupos de incompatibilidade

Fases do PCR		Programa
Desnaturação inicial	94°C	5'
Desnaturação	94°C	1'
Hibridação dos primers	60°C	30''
Síntese das cadeias	72°C	1'
Ciclos	30 ciclos	
Síntese final	72°C	5'

3.5 Estudo da variabilidade genética

Para o estudo da genotipagem, utilizou-se a técnica BOX-PCR. Os primers utilizados e as condições de amplificação de PCR estão descritos nas Tabelas 17 e 18, respectivamente, sendo os reagentes e os volumes utilizados de acordo com o que consta na Tabela 3, na secção 3.4.

Tabela 17: Sequência dos primers para amplificação por BOX-PCR.

Designação do Primer	Sequência	Referência Bibliografica
BOX	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	Tenover <i>et al.</i> (1995)

Tabela 18: Condições utilizadas nas reacções de amplificação por BOX-PCR.

Fases do PCR		Programa
		<i>BOX-PCR</i>
Desnaturação inicial	95°C	7'
Desnaturação	94°C	1'
Hibridação dos primers	53°C	1'
Síntese das cadeias	65°C	8'
Ciclos	35 vezes	
Síntese final	65°C	16'
Após final da reacção	15°C	∞

3.6 Purificação e Sequenciação de produtos de PCR

Os produtos de amplificação resultantes do ponto 3.4.4 foram purificados, utilizando o kit “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit ” (Zymo Research) conforme as instruções do fornecedor e posteriormente sequenciados. O electroforetograma resultante da sequenciação foi analisado com o programa Biont 7.0.9.

As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas na base de dados “Genbank”.

3.7 Electroforese em gel de agarose e visualização do DNA.

Eletroforese em gel de agarose é uma técnica que permite a separação de fragmentos de DNA num campo eléctrico. A percentagem de agarose é determinante para o tamanho dos fragmentos que se pretendem separar, e envolve a migração dos respectivos fragmentos de acordo com o seu tamanho, migrando os de menor peso molecular mais rapidamente do que os de maior peso molecular.

Deste modo, após as reacções de amplificação dos genes em estudo, os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose, utilizando TAE como tampão (Tris –Acetate – EDTA buffer). Os géis de agarose foram preparados a uma concentração de 1 % e após fundidos, foi adicionado brometo de etídio a uma concentração final de 10mg/ml, que permitiu a posterior visualização dos fragmentos de DNA sob luz UV. O volume de amostra aplicado no gel foi de 12 µl de cada amostra, e a electroforese decorreu a uma voltagem de 110 V e 90 V, na pesquisa de β-lactamases, integroes, zonas variáveis, *qnr's*, e elementos BOX, respectivamente.

Em todos os géis foi introduzido um marcador de DNA de peso molecular conhecido. O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos, foram determinados por comparação com a migração dos fragmentos de DNA conhecido. O marcador utilizado foi o GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) .

No final da electroforese o DNA foi visualizado num transiluminador de luz UV e a sua imagem adquirida no equipamento Bioinstruments ATTA.

4 Resultados e Discussão

4.1 Dados Epidemiológicos

Os dados apresentados referem-se a um estudo realizado entre 1 de Novembro de 2010 a 31 de Março de 2011 no laboratório de Microbiologia do Hospital Infante D. Pedro. Os isolados de *Acinetobacter baumannii* foram recolhidas de todos os produtos biológicos que apresentavam exame bacteriológico positivo.

4.1.1 Prevalência de *Acinetobacter baumannii* por Idade e Sexo

Durante os quatro meses de estudo foram obtidos 47 isolados de pacientes com exame bacteriológico positivo. A faixa etária em que *A. baumannii* é mais frequente está compreendida entre 81 e 90 anos de idade (45%) (Fig.17. A). Tendo em conta a distribuição por sexo, verificou-se ainda que o sexo masculino apresenta uma prevalência de 62% (Fig.17.B).

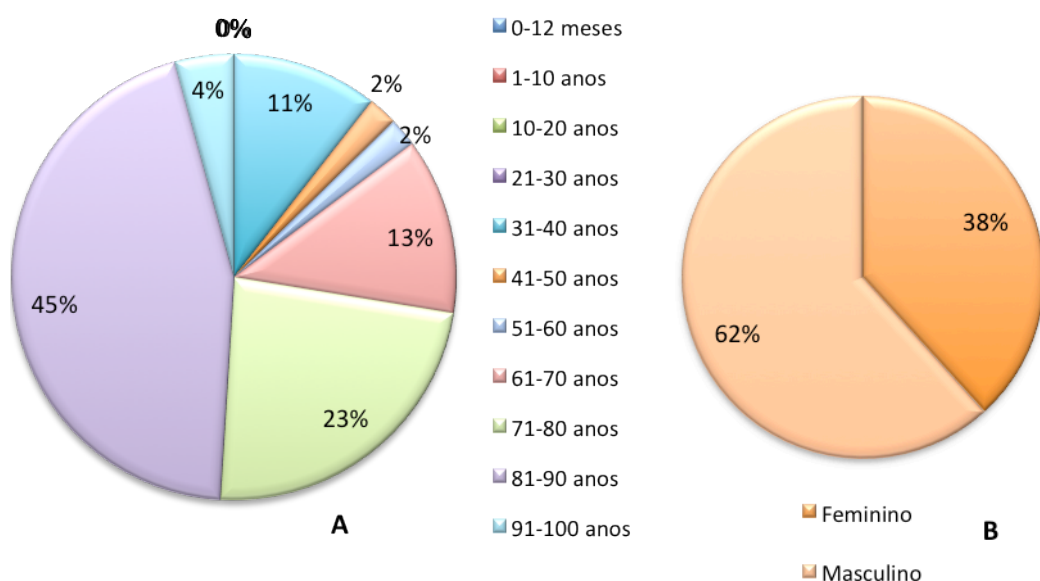


Figura 17: Distribuição de *A. baumannii* por faixa etária (A) e por sexo (B).

Estudos já realizados por diversos autores comprovam que como factores de risco, os idosos são mais propícios a estes acontecimentos, devido a um sistema imunitário mais fragilizado, reduzida mobilidade, pobre nutrição, dificuldade em realizar correctamente a higiene diária e alguns necessitarem de usar fraldas ou ainda pelo facto de estarem

algaliados. Todos estes factores condicionam a vulnerabilidade desta faixa etária (Scheeckler, *et al.*, 2003), o que pode justificar o resultado obtido.

4.1.2 Prevalência de *A. baumannii* por Serviço Hospitalar

Após a análise dos resultados obtidos verificou-se que o maior número de infecções por *A. baumannii* surgiu no Serviço de Medicina Intensiva (SMI) (32% dos isolados) como se pode verificar na figura 18, o que está de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores (Peleg, A, *et al.*, 2008).

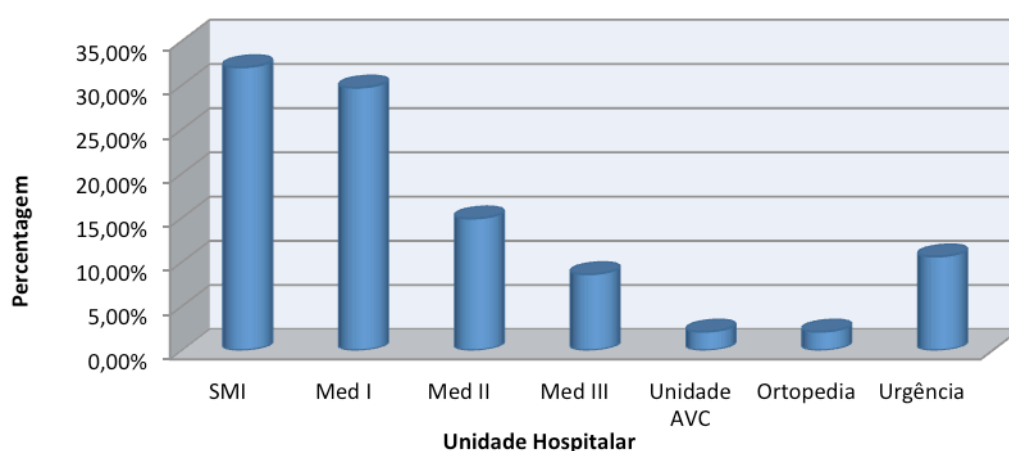


Figura 18: Percentagem de infecções por *A. baumannii* por serviço hospitalar.

Os pacientes que se encontram no SMI, são pacientes que se encontram em estado debilitado crítico, são geralmente pacientes imunodeprimidos, com doenças graves subjacentes, e que são frequentemente submetidos a procedimentos invasivos. Além disso, dado o estado em que se encontram, os indivíduos são submetidos a tratamentos com antibióticos de largo espectro, estando por vezes hospitalizados, durante um longo período de tempo. Sendo assim, estes factores são considerados de risco para o paciente, pois são favoráveis à aquisição de infecções / colonização por este microrganismo (Perez, F, *et al.*, 2007 and Maragakis, L, Perl, T, 2008).

4.1.3 Prevalência de *A. baumannii* por produto biológico

Relativamente á frequência de *A. baumannii* por produto biológico verificou-se que este microrganismo é mais frequentemente isolado a partir de expectorações (38,3 % dos casos), sendo seguido pelas urinas (36,1% dos casos), tal como se mostra na figura 19.

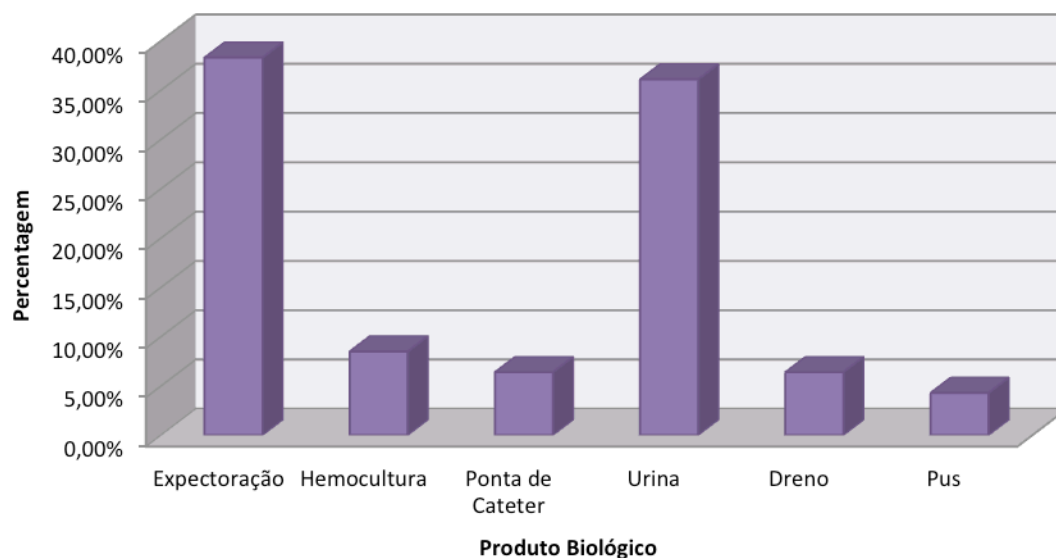


Figura 19: :Frequência de isolados de *A. baumannii* por produto biológico.

Normalmente, os isolados de *A. baumannii* apresentam diversos factores de virulência que permitem a sua sobrevivência no ambiente hospitalar, podendo por isso causar infecções, particularmente nos doentes debilitados (Kanafani & Kanj, 2008).

Os factores de virulência que permitem a sobrevivência e adaptação do referido agente ao ambiente hospitalar incluem: a capacidade em captar o ferro do meio ambiente sobrevivendo assim em condições de défice de ferro; resistência à secura; produção de uma cápsula polissacarídica; capacidade de aderência a diferentes superfícies pela formação de biofilmes (Wroblewska *et al.* 2008), e aderência às células do epitélio respiratório através de *pili* (Lee *et al.* 2006). Este microrganismo apresenta também uma virulência acrescida pois possui na parede celular um lipopolissacarídeo imunoestimulador, que permite a resistência ao sistema imunitário (Kanafani & Kanj, 2008). Além disso, tem a capacidade de provocar a apoptose celular através de proteínas da membrana externa (OMPs) (Gootz & Marra, 2008).

Assim, o resultado obtido poderá ser justificado pelo facto de este microrganismo ter a capacidade de aderir e colonizar facilmente as superfícies, tais como tubos de ventilação, ventiladores mecânicos e catéteres, pela formação de biofilmes. Esta característica, facilita assim a colonização de vários tipos de materiais, já referidos anteriormente e a posterior invasão das defesas do sistema imunitário dos pacientes.

A formação de biofilmes envolve diversos factores que são regulados pelo “*quorum sensing*”. A adesão inicial da bactéria às superfícies é então devida aos *pili* e às fímbrias, sendo seguida pela produção de um exopolissacarídeo, um importante constituinte do biofilme maduro que suprime a actividade dos neutrófilos. A variação dos factores envolvidos nesta e noutras vias são responsáveis pela capacidade da estirpe em colonizar ou

infectar (Gordon, N, Wareham, D, 2009).

Deste modo, pode extrapolar-se que provavelmente a razão deste resultado é o uso de um sistema de ventilação colonizado que, em pacientes imunodeprimidos, leva a infecções do tracto respiratório, traduzido pela expectoração.

Relativamente às urinas, o uso de algalias poderá justificar o resultado obtido. A nível hospitalar muitos dos indivíduos encontram-se algaliados, o que favorece a contaminação da bexiga através da progressão de bactérias pelo tracto urinário.

4.2 Perfil de resistência aos antibióticos dos isolados de *A. baumannii*

4.2.1 Perfil de resistência/sensibilidade de *A. baumannii* aos antibióticos testados

O antibiograma realizado nos isolados de *A. baumannii* causadores de infecções a nível hospitalar testa uma vasta gama de antibióticos. O antibiótico ao qual os isolados se mostraram mais sensíveis é a colistina (27,3%), uma Polimixina E (Figura 20).

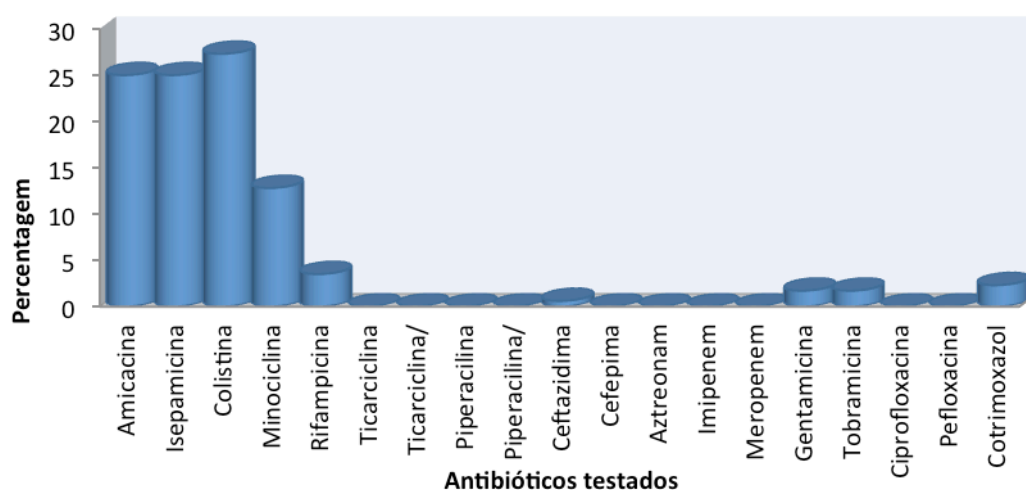


Figura 20: Perfil de susceptibilidade/resistência de *A.baumannii* às diferentes classes de antibióticos testados.

Dadas as limitações de opções terapêuticas, os médicos recorrem ao uso da polimixina B ou polimixina E (colistina) para tratar a maioria das infecções por *Acinetobacter* multirresistente. As Polimixina B e E são antibióticos polipeptídicos, produtos da fermentação de *Bacillus polymyxa*. Estes foram usados pela primeira vez em 1947, e têm sido cada vez mais usados como “último recurso” no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente (Pérez, F, et al., 2007).

A colistina actua sobre a membrana celular bacteriana aumentando a permeabilidade da mesma, levando, deste modo, à morte celular (Maragakis, L, Perl, T, 2008).

Estudos realizados por Kallel, H, *et al.*, 2010, têm mostrado que as taxas de sucesso, recorrendo ao uso de colistina, estão compreendidas entre os 57% e 77% dos indivíduos que se encontram com infecções graves por *A. baumannii*, incluindo pneumonias, bacteriemias e septicémias.

Outros estudos de Garnacho-Montero, J, *et al.*, 2003, mostraram ainda que as taxas de resposta clínica no tratamento de pneumonias por *Acinetobacter* associadas à ventilação mecânica, situam-se entre os 56 e 66% dos casos, justificando o resultado obtido neste estudo.

Relativamente à percentagem de resistências e tal como referido anteriormente, os isolados de *A. baumannii*, têm uma grande capacidade de desenvolver rapidamente mecanismos de resistência aos antimicrobianos e, embora a definição de multirresistente e panresistente esteja em debate, não há dúvidas que estas bactérias de Gram-negativo, apresentam resistência a todas, ou a quase todas, as classes de antibióticos usadas habitualmente na prática clínica (Gordon, N, Wareham, D, 2010).

Neste estudo, e de acordo com o antibiograma obtido para cada isolado, pode-se verificar que as estirpes recolhidas apresentam um elevado número de resistências.

A resistência aos β -lactâmicos está principalmente relacionada com a expressão de β -lactamases, tendo um papel secundário as alterações da permeabilidade da membrana externa, a modificação de proteínas de ligação à penicilina, e ao aumento da actividade das bombas de efluxo. Assim, é possível justificar os resultados obtidos na percentagem obtida de resistências de Penicilinas (Piperacilina, e Ticarcilina), Monobactâmicos (Aztreonam), Cefalosporinas (Cefepima e ligeiramente mais abaixo Ceftadizima) e Carbapenemos (Imipenemo e Meropenemo).

A. baumannii, produz, intrinsecamente, uma cephalosporinase do tipo AmpC, que é normalmente expressa a nível basal, e que não reduz a eficácia das cefalosporinas ou dos carbapenemos. No entanto, a adição de sequências específicas de inserção (IS), elementos IS*Aba1* (pertencentes à família IS4) faz com que o gene *bla_{ampC}* aumente a expressão da β -lactamase do tipo AmpC levando à resistência às cefalosporinas (ceftazidima e cefepima).

Alguns relatos, justificam ainda a resistência à penicilina + inibidor (ácido clavulânico) em *A. baumannii*, sendo estes inibidos por penicilinases (TEM-1, TEM-2 e CARB-5), e oxacillinasas resistentes ao ácido clavulânico (OXA-20 e OXA-21).

A inibição do ácido clavulânico por β -lactamases de largo espectro (ESBLs) foram relatadas não só em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas também em *A. baumannii* (Nordmann, P, Poirel, L, 2008).

De entre os β -lactâmicos, os carbapenemos são considerados os antibióticos mais eficazes, sendo por isso chamados os de “última linha”. No entanto, a produção de carbapenemases constitui um dos mecanismos de resistência emergente aos carbapenemos (Brown, S, Amyes, S, 2006). Deste modo, a resistência aos carbapenemos é, considerada suficiente para definir um isolado de *A. baumannii* como altamente resistente.

A resistência de isolados de *A. baumannii* aos carbapenemos pode ser mediada por um dos seguintes mecanismos de resistência: inativação enzimática, alteração dos locais de ligação ou bombas de efluxo. No entanto, a produção de β -lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico dos carbapenemos é o mecanismo mais comum, e é o responsável pela resistência a este grupo de antibióticos, em *A. baumannii*, tal como se verifica com a resistência ao imipenemo (Maragakis, L, Perl, T, 2008). Existem ainda, metalo- β -lactamases (VIM, IMP e SIM), que têm sido relatados esporadicamente em algumas partes do mundo e têm sido associados com integroões classe 1. No entanto, as carbapenemases mais comuns em *A. baumannii* são as β -lactamases classe D (tipo OXA) (Zarrilli, R, *et al.*, 2009).

A resistência de *A. baumannii* às quinolonas, neste estudo demonstrado pela resistência à ciprofloxacina e pefloxacina, está descrito como estando associado a alterações na DNA girase, por mutações nos genes *gyrA* e *parC*, impedindo a ligação deste antibiótico ao alvo bacteriano (Peleg, A, *et al.*, 2008). Outro mecanismo, associado à resistência das quinolonas é a existência de bombas de efluxo, que diminuem a concentração do antibiótico dentro da bactéria, fazendo com que este não exerça a sua acção (Perez, F, *et al.*, 2007). É ainda de notar, que podem surgir genes que conferem resistência a esta classe de antibióticos (genes *qnr*), geralmente presentes em plasmídeos. Apesar de existirem várias variantes deste gene, apenas o gene *qnrA* tem a capacidade de modificar a ciprofloxacina (Touati, A, *et al.*, 2008).

Relativamente, às elevadas resistências encontradas neste estudo, é ainda de notar que o cotrimoxazol (sulfonamidas + trimetoprim) é um grupo de antibióticos para o qual estas bactérias apresentam uma elevada resistência.

O Trimetoprim (TMP) e as Sulfonamidas (SULs) possuem um elevado espectro antibacteriano. Dado o seu espectro de acção e o seu baixo custo, esta combinação de TMP+SUL foi muito utilizada em todo o mundo, incluindo nos países menos desenvolvidos (Huovinen,P, 1995).

Ao longo das três décadas anteriores, a combinação do sulfametoxazol + trimetoprim ocupou o papel central no tratamento de várias infecções, tanto nas mais comuns como nas infecções mais específicas e graves. No entanto, o aparecimento de bactérias resistentes levou a uma mudança de comportamento no que refere à utilização deste grupo de antibióticos na prática clínica, apesar de ainda continuar a ser uma alternativa em muitos casos (Masters, P, *et al.*, 2003). A resistência a estes antibióticos, normalmente está associada à presença de integroões classe 1 (Peleg, A, *et al.*, 2008), tal como se verificou no presente estudo e será mostrado mais adiante.

4.3 Pesquisa de Integroões

4.3.1 Pesquisa de Integrase classe 1 em *Acinetobacter baumannii*

A pesquisa do gene integrase classe 1 (*int1*) foi efectuada em todos os isolados seleccionados, e verificou-se que apenas 10 dos isolados de *A. baumannii* (21%) foram negativos para este gene, e que 37, ou seja, 79% dos isolados foram positivos para o gene *int1* (Figura 21). Nas estirpes que se verificou que possuíam o gene *int1* procedeu-se à realização de um novo PCR para a pesquisa / amplificação das respectivas zonas variáveis.

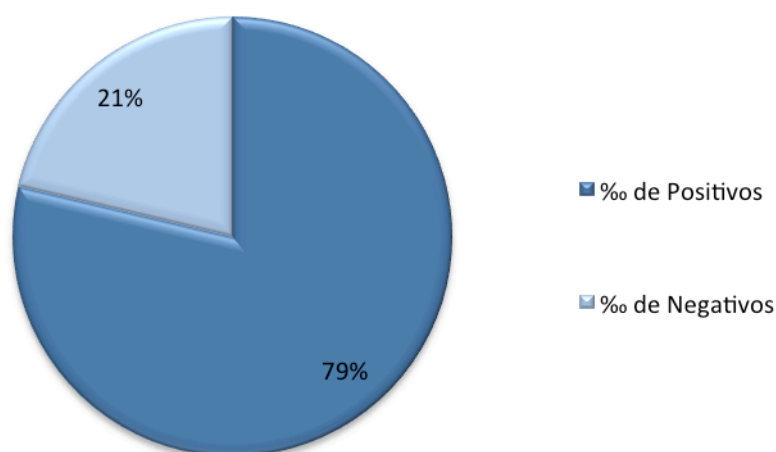


Figura 21: Percentagem de gene *int1* em *Acinetobacter baumannii*.

Tal como referido anteriormente, um factor importante que contribui para o aparecimento da resistência aos antibióticos é a aquisição e transferência de genes de resistência (Kraniotaki, E, *et al.*, 2006).

Assim, relativamente aos integrões de classe 1, e de acordo com estudos realizados por Kraniotaki, E, *et al.*, 2006, verificou-se que estes são os mais prevalentes das 3 classes de integrões existentes e entre as bactérias de Gram-negativo, incluindo em *A. baumannii*.

4.3.2 Pesquisa das Zonas Variáveis

Dos 37 isolados (79%) positivos na pesquisa de integrase classe 1, submetidos a um novo PCR para pesquisa das respectivas zonas variáveis, 10 isolados foram negativos (27%), sendo os restantes 27 (73%) positivos, estando os tamanhos dos fragmentos na gama dos 3000 bp (figura 22 e 23).

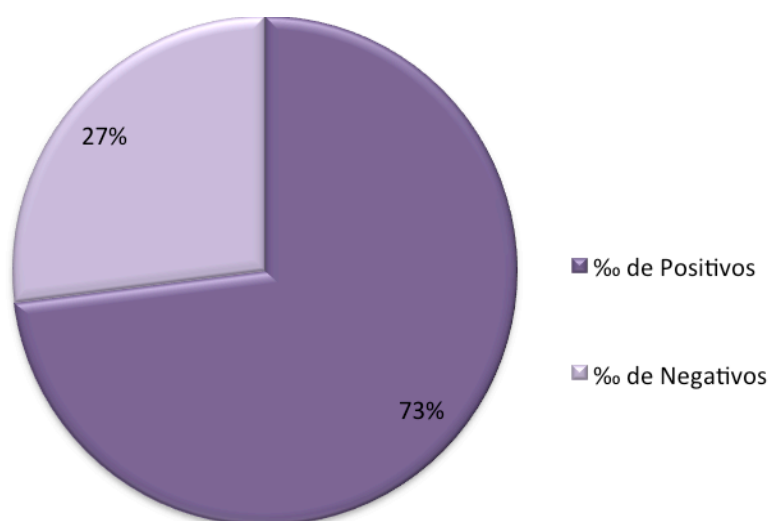


Figura 22: Percentagem de zonas variáveis em 79% isolados de *Acinetobacter baumannii* com *Int1*.

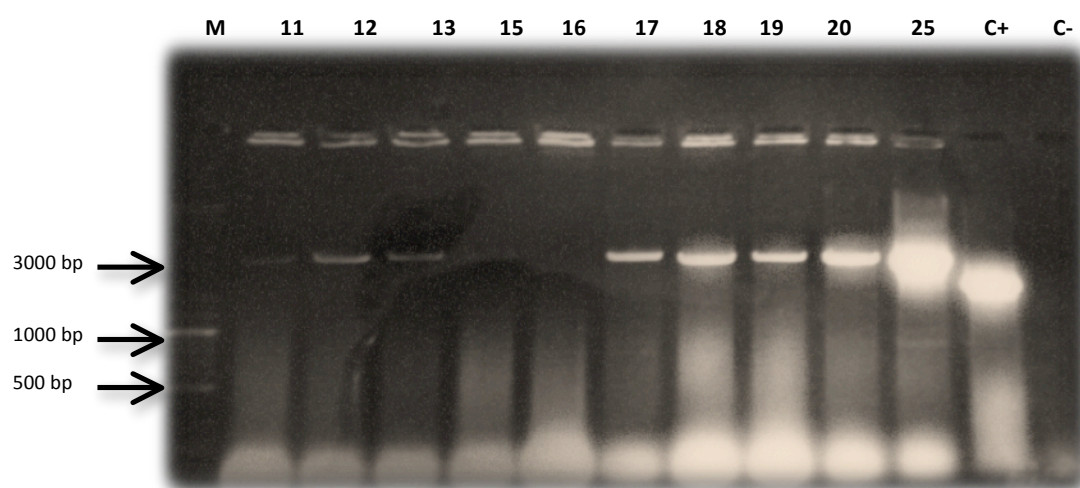


Figura 23: Electroforese em gel de agarose das amostras de *A. baumannii* contendo *Int 1*, sujeitas à amplificação da respectiva Zona Variável

Os resultados obtidos após sequenciação das zonas variáveis obtidas, demonstraram uma grande extensão das zonas variáveis amplificadas (3000 bp o que corresponde a 3

genes cassette). Após se proceder à digestão dos amplicões obtidos com a enzima *Taq1*, verificou-se que todos possuíam a mesma região variável e após sequenciação verificou-se tratar-se dos genes *aacA4*, *aadA1*, que conferem resistência aos aminoglicosídeos, justificando assim a resistência à gentamicina e do gene *CatB8* que confere resistência ao cloramfenicol. Esta é a primeira vez que este array é encontrado em Portugal e em *A. Baumannii*, tendo sido a sua sequência depositada no Genbak (acession number JN415765). No entanto, anteriormente já tinha sido encontrado nos Estados Unidos da America (USA), Londres e em Taiwan também em *Acinetobacter baumannii*. A figura 24 mostra a estrutura do integrão encontrado.



Figura 24: Integrão e respectivos genes cassetes encontrados nos isolados positivos para Integrase Classe 1 e com Região Variável amplificada.

4.3.3 Pesquisa de *sul3* e *tniC*

De um total de 27 amostras, 10 que possuíam integrase classe 1, mas das quais não foi possível amplificar a respectiva zona variável, procedeu-se à pesquisa dos genes *sul3* e *tniC*. Neste caso a pesquisa foi negativa para ambos os genes em todas as amostras.

4.3.4 Pesquisa de elementos *ISCR1*

Das 27 amostras que possuíam integrase de classe 1 e cuja zona variável, se amplificou, procedeu-se à pesquisa de elementos *ISCR1*, verificando-se que nenhuma das amostras apresentava este elemento.

4.3.5 Pesquisa de Integrões de classe 2 e Integrões de classe 3

A pesquisa de integrões de classe 2 e integrões de classe 3 foi efectuada nos 47 isolados de *A. baumannii* seleccionados e verificou-se que nenhuma estirpe possuía o gene para integrase classe 2, e de classe 3. Assim, e de acordo com estudos realizados por Kraniotaki, E., *et al.*, 2008 verificou-se que os integrões de classe 1 são os mais prevalentes em *A. baumannii* (figura 26).

4.4 Pesquisa de genes de β -Lactamases

Foi realizada a pesquisa para diferentes variantes de enzimas β -lactamases para todos os isolados recolhidos.

Tal como referido anteriormente, *A. baumannii* é um microrganismo multirresistente, apresentando por isso, um elevado número de resistências aos antibióticos testados e utilizados na actualidade. Deste modo, e sendo os β -lactâmicos, os principais antibióticos utilizados, é de elevada importância o estudo e pesquisa de enzima β -lactamases de forma a compreender-se as resistências deste microrganismo.

Neste estudo procedeu-se à pesquisa das enzimas beta-lactamases VIM, IMP, KPC, MOX, FOX, ACC, CMY, DHA, OXA, SHV, CTX e TEM. O resultado foi negativo para todos os genes pesquisados. Contudo, verificou-se que no caso do genes TEM e DHA o tamanho do fragmento obtido após amplificação tinha o tamanho esperado, no entanto, após a sequenciação do amplicão verificou-se que os fragmentos apresentavam elevada homologia (99%) com bombas de efluxo. Estes resultados alertam para o facto de que, por vezes, apesar da obtenção de um produto de amplificação de um determinado gene com o tamanho correcto/esperado, o resultado deve ser sempre confirmado por sequenciação de DNA, uma vez que pode levar a uma interpretação incorrecta do mecanismo associado a uma determinada resistência.

4.5 Pesquisa de genes *qnr*

A resistência às quinolonas deve-se em grande parte, à existência de bombas de efluxo, que diminuem a concentração do antibiótico dentro da bactéria, fazendo com que este não exerça a sua acção (Perez, F, *et al.*, 2007). No entanto, existem outros mecanismos que conferem resistência a esta classe de antibióticos como é o caso da resistência mediada por plasmídeos (genes *qnr A*, *B* e *S*) que têm a capacidade de modificar a ciprofloxacina. Estes genes foram alvo de estudo deste trabalho.

Assim, e apesar de terem sido obtidos fragmentos correspondendo aos genes *qnr A* e *qnr B* com o tamanho esperado, a sequenciação foi inconclusiva, sendo o electroforetograma duvidoso. Após re-sequenciação o electroforetograma continuava confuso não tendo sido possível tirar qualquer conclusão no que refere à identidade dos genes em causa.

A pesquisa do gene *qnrS* foi negativa para todos os isolados.

4.6 Pesquisa de grupos de incompatibilidade de plasmídeos.

De 5 isolados que apresentavam integrase classe 1, e nos quais se detectou a presença de plasmídeos pesquisou-se a presença de grupos de incompatibilidade,

frequentemente encontrados nesta espécie, de forma a poder caracterizar-se o tipo de plasmídeo presente. Contudo, após sequenciação dos amplicões obtidos, verificou-se que, os fragmentos obtidos não correspondiam aos grupos de incompatibilidade de plasmídeos pesquisados.

4.7 Estudo da variabilidade genética

Sendo os isolados provenientes do meio hospitalar, foi ainda objectivo deste estudo avaliar a sua variabilidade genética. Esta pesquisa foi realizada recorrendo à técnica de BOX-PCR. A análise dos produtos de amplificação obtidos permitiu verificar que estávamos perante a mesma espécie a nível hospitalar, sendo, no entanto, possível reconhecer diferentes estirpes da mesma espécie.

Deste modo pode-se concluir que nos isolados estudados, existem alguns que pertencem a diferentes estirpes, enquanto outros são clones, tal como se pode visualizar na figura 25, e no respectivo dendrograma, obtido com o programa informático GelCompar II.

Assim, detectou-se a presença de 6 grupos clonais. Esses grupos clonais eram formados pelos isolados 2, 3 e 4, com um grau de semelhança de 100%, e provenientes do serviço de medicina intensiva (SMI); pelos isolados 33 e 38 com um grau de semelhança de 92,3%, e provenientes do serviço de medicina I e medicina II respectivamente; pelos isolados 37 e 43 com um grau de semelhança de 94,1 %, provenientes do serviço de medicina I; pelos isolados 10, e 12, com um grau de semelhança de 100%, de amostras provenientes do serviço de medicina intensiva (SMI); pelos isolados 13 e 14, com um grau de semelhança de 94,7% provenientes do serviço de medicina intensiva e medicina II respectivamente e pelos isolados 17 e 18 com um grau de semelhança de 95,7%, provenientes do serviço de medicina I e II. Verificou-se ainda que os isolados que constituem estes grupos clonais provêm na sua maioria de amostras de urina e expectoração, o que vai de encontro aos resultados obtidos e esclarecidos anteriormente.

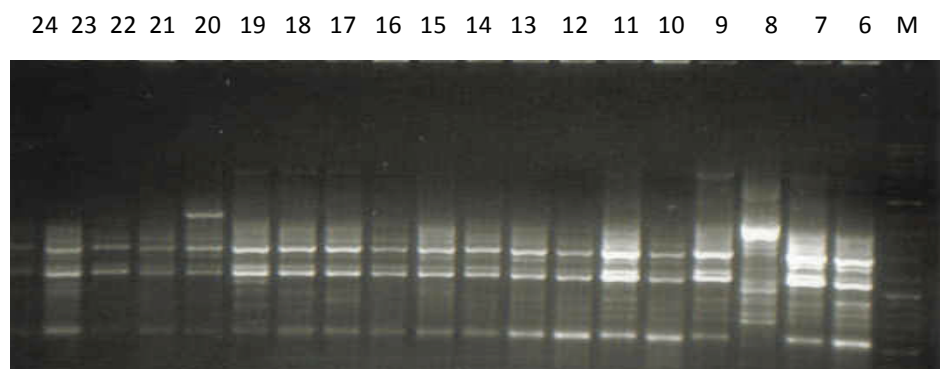


Figura 25: Imagem de electroforese do perfil dos respectivos isolados de *A. baumannii* por BOX-PCR

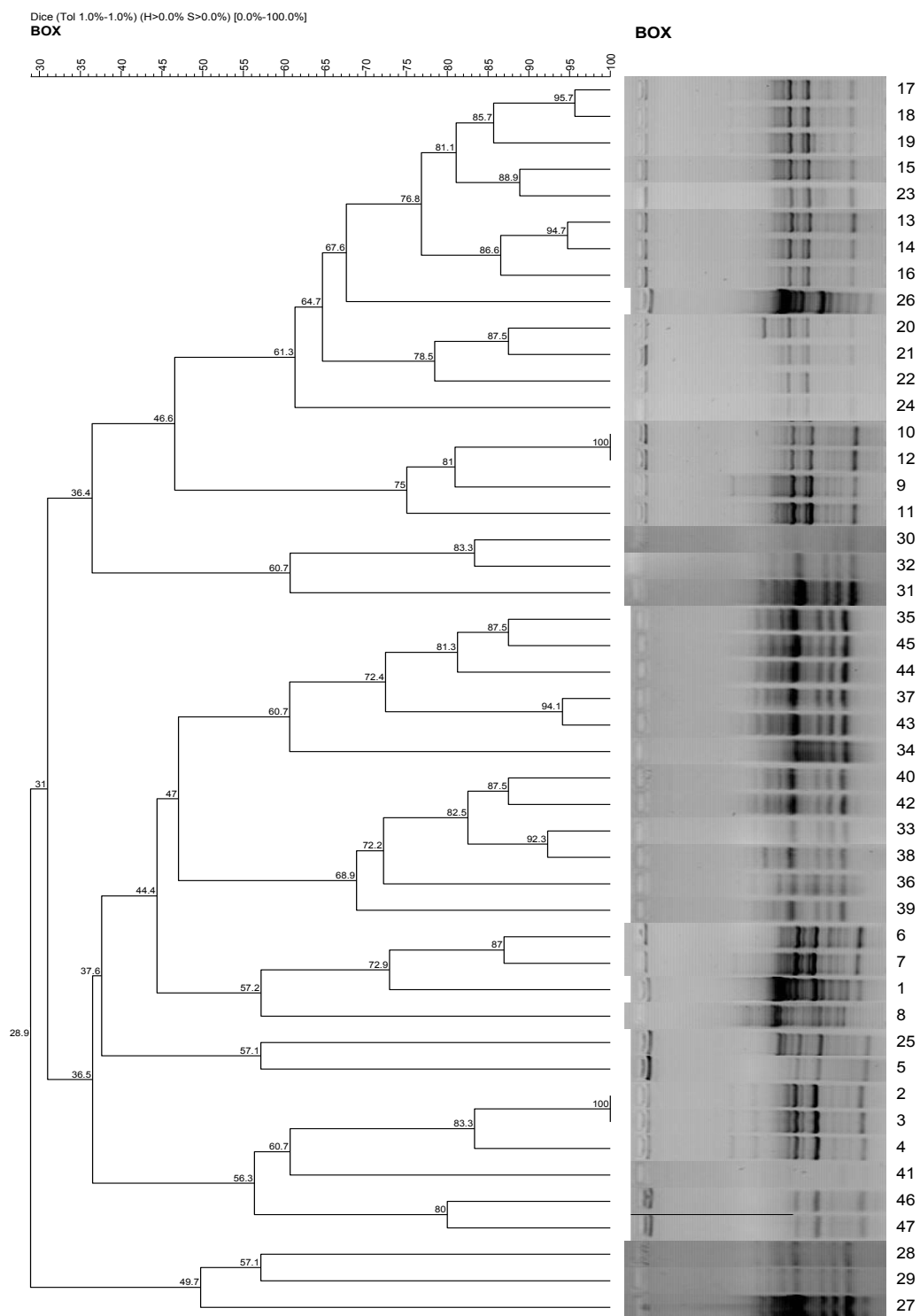


Figura 26: Dendrograma obtido de forma a avalia a variabilidade genética dos isolados recolhidos.

5 Conclusão

O presente trabalho confirma que a espécie *A. baumannii* é um microrganismo multirresistente, associado frequentemente aos cuidados intensivos de saúde e a sua grande variedade de factores determinantes da resistência aos antibióticos, juntamente com a sua capacidade de regular esses mecanismos com as condições ambientais adversas, torna-o num microrganismo preocupante para a Saúde pública.

A sua disseminação, na maior parte das vezes clonal, dentro das instituições de saúde, faz com que este patógeno nosocomial, esteja associado a elevadas taxas de mortalidade e morbilidade.

Dos 47 isolados de *Acinetobacter baumannii* provenientes de produtos biológicos de pacientes com exame bacteriológico positivo, que deram entrada no serviço de Patologia Clínica do Hospital Infante D. Pedro foi possível concluir que a faixa etária em que *A. baumannii* é mais frequente está compreendida entre 81 e 90 anos de idade, o que se deve certamente a um sistema imunitário mais fragilizado. Relativamente à prevalência por produto biológico verificou-se que *A. baumannii* ocorre mais frequentemente em expectorações e urinas, facto justificado pela capacidade deste microrganismo aderir facilmente a superfícies, como algalias e tubos de ventilação, formando biofilmes. Estes materiais uma vez colonizados, poderão ser responsáveis por futuras infecções em indivíduos que se encontrem imunologicamente debilitados.

Quanto aos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), *A. baumannii* é mais sensível a colistina, uma polimixina E, usada actualmente como último recurso para o tratamento de infecções por *A.baumannii*. No entanto, é preocupante o facto deste microrganismo multirresistente, apresentar elevadas resistências a quase todos os antibióticos testados, inclusivé aos carbapenemos que são considerados de “última linha” em ambiente hospitalar.

Neste estudo detectou-se ainda, a existência de integrões classe 1 e a presença de 6 grupos clonais, provenientes na sua maioria do serviço de medicina intensiva, com um grau de semelhança de 100% e do serviço de medicina I e II, com uma homologia aproximadamente de 94 %.

Assim, é de elevada importância o estudo dos mecanismos de resistência destes patógenos, de forma a tentar perceber e melhor seleccionar as opções terapêuticas existentes.

Assim, as principais conclusões foram:

- *A. baumannii* possuíam uma elevada percentagem de integrões classe 1 com uma zona variável de 3000 pb o que corresponde a 3 genes cassetes (aaCA4, aadA1 e CatB8), o que pode estar na origem do seu perfil de resistência.
- Dado o perfil de resistência dos isolados de *A. baumannii* recolhidos estaríamos à espera de conseguir encontrar genes codificantes de enzimas beta-lactamases. Contudo, apesar de ter ocorrido amplificação, após sequenciação verificou-se que o resultado das amplificações obtidas foi negativo para os genes em estudo. Os produtos amplificados apresentavam uma sequência de nucleótidos com homologia (99%) com bombas de efluxo, não sendo possível por isso tirar nenhuma conclusão desta pesquisa.
- No caso concreto dos genes TEM E DHA, embora o tamanho do fragmento amplificado fosse o esperado para os genes em estudo, a análise da sequenciação nucleotídica revelou tratar-se de bombas de efluxo, o que reforça a importância da confirmação dos resultados por determinação da sequenciação nucleotídica, mesmo nestes casos .
- Apesar de estes isolados possuírem plasmídeos, a pesquisa de grupos de incompatibilidade frequentemente encontrados nesta espécie foi negativa.
- A presença de 6 grupos clonais dos isolados provenientes do serviço de medicina intensiva, alguns deles com 100% de semelhança, reflectem a fonte de disseminação existente no meio hospitalar, entre os doentes internados e os equipamentos utilizados nos serviços.

Assim como perspectivas futuras seria importante explorar melhor estes resultados e tentar perceber que outros mecanismos de resistência poderão estar na base do perfil fenotípico que se observa nos isolados estudados, bem como perceber a fonte de disseminação destes isolados.

6 Bibliografia

- Alberts,B, *et al.* Molecular Biology of the Cell. Fourth edition Garland Science. 2001.
- Aminov, R. The Role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Env. Microbiol.* 2009; 11:2970-2988.
- Antibiotic Multi-Resistance Problem. *Animal Biotechnology.* 2006; 17:125 - 135.
- Asbel, L,Levinson,M. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. 2000;14:435-47.
- Barchiatta, M, *et al.* Aquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. *Int. J. Hyq Environ. Health.* 2009; 212:330-337.
- Barlow, R, *et al.* Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 838–842.
- Bennett, P. Integron and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria.1999;43:1-4.
- Bergogne- Bérezin, E, Towner, K. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol.* 1996; 9:148-165.
- Biomerieux. Meios de Cultura. 2003.
- Bryan, CS. Clinical Implications of Positive cultures. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 2: 329-353.
- Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter* the story so far. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(1): 1-3.
- Butler, C, *et al.* Containing antibiotic resistance: decreased antibiotic-resistant coliform urinary tract infections with reduction in antibiotic prescribing by general practices. *British J. Gen. Practice.*2007; 785-791.
- Calvo, J, Martínez, LM. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc.*

Microbiol. Clin. 2009; 27:44-52.

Carattoli, A, *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J. Microbiol. Methods. 2005; 63: 219-228.

Cisneros, J. M. and J. Rodriguez-Bano. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. Clin. Microbiol. Infect. 2002; 8:687-693.

Dijkshoorn, L, *et al.* An increasing threat in hospitals: multidrug – resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat. Rev. Microbiol. 2007; 5:939-951.

Dover, L, *et al.* Regulation of cell wall synthesis and growth. 2007; 7:247-276.

ECDC. Antimicrobial resistance 2010: global attention on carbapenemase - producing bacteria. 2010.

Falagas, M, *et al.* Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. Critic. Care. 2006; 48:1-8.

Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influenza. Br. J. Exp. Pathol. 1929; 10:226–236.

Fluit, A, Schmitz, F. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clinic. Microbiol. rev. 2001; 14: 836-871.

Fluit, A. Resistance integrons and super-integrons. Clinical Microbiology & Infection. 2004; 10: 272-288.

Fontana, C, *et al.* Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. BMC Research Notes. 2010; 3(1): 40.

Fournier, P, Richet, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in the

health care facilities. Clin. Infect. Dis. 2006; 42:692-699.

Garnacho-Montero, J, et al. Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) with Intravenous Colistin: A Comparison with Imipenem-Susceptible VAP.clin infect dis 2003;36:1111-1118

Giamarellou, H, et al. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? Int. J. Antimicrob. Agents. 2008; 32: 106-119.

Griffiths A, et al. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. 2000.

Gootz T, Marra A (2008). *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6: 309-325.

Gordon, N, Wareham, D. Multidrug – resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int. Journal Antimicrob Agents. 2010; 35:219-226.

Gordon, N, Wareham, D. Evaluation of CHROMagar *Acinetobacter* for Detection of Enteric Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Samples from Critically Ill Patients. Journal Antimicrob Agents. 2009;47:2249-2251.

Harbottle, H, et al. Genetics of antimicrobial resistance Animal Biotechnology. 2006; 17:111-114.

Henriques, I, et al. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res Microbiol 2006; 157: 938–947.

Hoff, B, et al. Eighty Years after Its Discovery, Fleming's *Penicillium* Strain Discloses the Secret of Its. Americ. Soc. Microb. 2008; 7:465-470.

Huovinen, P, et al. Trimethoprim Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1987; 31:1451-1456.

Huovinen, P, et al. Trimethoprim and Sulfonamide Resistance. Antimicrobial agents and

chemotherapy. 1995;39:279–289.

Joly-Guillou, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin. Microbiol. Infect. 2005;11:868-873.

Kallel H, *et al.* Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. Intensive Care Med. 2010;33:1162-7.

Kanafani & Kani. Microbiology, pathogenesis, and epidemiology of *Acinetobacter* infection. 2008

Kielhofner, M. Trimethoprim-Sulfamethoxazole: Pharmacokinetics, Clinical Uses, and Adverse Reactions. 1990 ;17:86-93.

Kraniotaki, E, *et al.* Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, with characterisation of class 1 integrons. 2006.

Leclercq, M, *et al.* Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:727-737.

Lee, H, *et al.* Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14:49-54.

Lee, N, *et al.* Beta-Lactam antibiotic and beta-lactamase inhibitor combinations. Jama. 2001; 285:386-388.

Livermore, D, Brown, D. Detection of beta-lactamases mediated resistance . J. Antimicrob. Chemother. 2001 ; 48: 59-64.

MacGowan, A. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. J. Antimicrob. Chemother. 2008; 62: 105-114.

Magnet, S, Blanchard, J. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chem.

Rev. 2005; 105:477-397.

Maragakis, L, Perl, M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. Clin. Infect. Dis. 2008; 46:1254-1263.

Martínez, J, Baquero, F. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15:647-679.

Masters, P, et al. Trimethoprim- Sulfamethoxazole Revisited. Arch Intern Med. 2003; 163:402-410.

Montefour, K, et al. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Multidrug-Resistant Pathogen in Critical Care. Critic. Care Nurse. 2008; 28:15-25.

Moura, A, et al. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. J. Antimicrob. Chemother. 2007; 60(6): 1243-1250.

Nordmann, P, Poirel, L. *Acinetobacter baumannii*- Basic and Emerging Mechanisms of Resistance. Bacterial Infections. 2008.

Peleg, A, et al. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 2008; 21: 538-582.

Perez, F, et al. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. America. Soc. Microbiol. 2007; 51: 3471-3484.

Perez, F, et al. Why are we afraid of *Acinetobacter baumannii*? Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2008; 6 :269-271

Perez, J, et al. Antibióticos aminoglucósidos. Medicine. 1998; 76:3515-3523. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J. Antimicrob. Chemother. 2005; 56:20-51.

Perez-Perez, F, and Hanson, N. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes

in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol.2002; 40 : 2153 - 2162.

Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J. Antimicrob. Chemother.2005; 56:20-21.

Rada, B, *et al.*Quinolonas. Medicine. 1998; 72: 3344 - 3353.

Rice, L. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Infect. Dis. 2006; 43: 100 - 105.

Rodriguez- Bano, J, *et al.*Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14: 276-278.

Rosenstiel, N, Adam, D. Quinolone antimicrobials. An update of their pharmacology and therapeutic use drugs. 1994; 47:872-901.

Sabaté, M. Estrutura y function de los integrons.Enf.Infecc.Microbiol. Clin.2002;20:341-345.

Santos, C, *et al.* A novel complex class 1 integron found in a Klebsiella pneumoniae isolate from Portugal. Clinical Microbiology and Infection.2010; 16 (10): 1558-156.

Scheckler, WE, Hadden, MD, *et al.* Bloodstream infection in a community hospital: a 25 year follow-up. Infec.Contr. Hosp. Epidemiol. 2003; 24:936-941.

Sebeny, P, *et al.**Acinetobacter baumannii* Skin and Soft-Tissue Infection Associated with War Trauma. Clin. Infect. Dis. 2008; 47: 444-449.

Shakil, S, *et al.*Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground.J.Biomedic. Scienc. 2007; 15:5-14.

Siegel, R. Emerging Gram-Negative Antibiotic Resistance: Daunting Challenges, Declining Sensitivities, and Dire Consequences. Respir. Care. 2008; 43: 471-478.

Siegman-Igra, Y, Fourer, B, *et al.* Reappraisal of community-acquired bacteremia: A proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. Clin. Infect. Dis. 2002; 34:1431-9.

Singh, A, *et al.* Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. Clin. Microbiol. Rev. 2006;19: 512-530.

Sousa, JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Fundação Fernando Pessoa. Porto. 2006.

Suárez, C, Guadiol, F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27:116-29.

Summers, A. Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Wagner, A. Cooperation is Fleeting in the World of Transposable Elements. Comput Biol. 2006;12:162.

Tenover, F, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 2233-2239.

Touati, A, *et al.* First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008.

Torres, A, *et al.* Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: Clinical update and new highlights. Rev. Esp. Quimioter. 2010; 23: 12-19.

Zarrilli, R, *et al.* Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries 2009; 3:335-341.

Vance, J, M. Genetic Analysis of Complex Diseases, Second Edition. Chapter 6: Methods of Genotyping. 2005.

Wagner, A. Cooperation is Fleeting in the World of Transposable Elements. Comput Biol. 2006;12:162.

Weinstein, MP, Towns, ML, *et al.* The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin. Infect. 1997; 24:584-602.

Wroblewska et al. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. Immunol Med Microbiol. 2008;53:140-4.

Wu, J, *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnrA, qnrB, and qnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 1223–1227.

Yoshida, T, Tsushima, K, *et al.* Risk Factors for Hospital-acquired Bacteremia. Intern. Medic. 2005; 44: 1157-1161.